



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESTUDIO DE BIOFILMS ORALES SOBRE SUPERFICIES DE IMPLANTES DENTALES

**TESIS DOCTORAL
Patricia Bermejo Caballero**

Madrid, 2019

Directores:

Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso

Prof. Dra. Dña. Elena Figuero Ruiz





UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. PATRICIA BERMEJO CABALLERO

con número de DNI/NIE/Pasaporte 50545873S, estudiante en el Programa
de Doctorado de Ciencias Odontológicas,
de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Estudio de biofilms orales sobre superficies de implantes dentales

y dirigida por: Prof. Dra. Dña. Elena Figueru Ruiz y Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 4 de junio de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE BIOFILMS ORALES SOBRE SUPERFICIES DE
IMPLANTES DENTALES

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA
POR

Patricia Bermejo Caballero

Directores

Mariano Sanz Alonso
Elena Figuero Ruiz

Madrid

A mis padres Ascen e Isaac,
por estar siempre ahí para que yo pueda estar aquí.

“El entorno da forma a las acciones del individuo”
Burrhus Frederic Skinner

Agradecimientos

Concluir mis estudios de doctorado con la presente tesis doctoral ha sido, sin duda, uno de los procesos más difíciles que he vivido académicamente. Muchas son las personas que durante estos años han contribuido de diferentes maneras a la realización de la misma y, por ello, me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a cada una de ellas.

Gracias en primer lugar a mis directores, la Profesora Elena Figuro y el Profesor Mariano Sanz. Gracias por acogerme en la familia de la UCM y por darme la posibilidad de llevar a cabo este proyecto. Gracias por vuestra atención, consejos y paciencia.

Al Profesor David Herrera, por sus recomendaciones y aportaciones siempre bienvenidas.

Gracias a mis compañeras de laboratorio Ana O'Connor, Marta García y a la Dra. María José Marín, por la ayuda y la paciencia que me han concedido en el laboratorio durante la realización de los experimentos. Gracias a la Dra. Arancha Llama Palacios por su apoyo y gestos de cariño inagotables durante todos estos años y a la Dra. María Sánchez, por darme toda la ayuda que estaba en sus manos día tras día. Gracias chicas, han sido cinco años de bonitos recuerdos.

Gracias a Leire Virto, Oksana Potupa, Honorato Vidal y Patricia Romero, con vosotros he compartido laboratorio, comidas, talleres, congresos y lo más importante, amistad. Me llevo de esta experiencia cuatro grandes amigos, cuatro grandes personas. Patricia, qué te voy a decir...¡Lo conseguimos!, tanta incertidumbre, tantos nervios y tantos malos ratos que se han sobrellevado tomando un café juntas. Gracias, me siento muy afortunada de haber conocido a alguien como tú en esta aventura, aquí me tienes para siempre.

Por último, y no por ello menos importantes sino todo lo contrario, gracias a mi familia. Gracias a Borja, mi compañero de viaje. Te conocí durante el camino del doctorado y has vivido cada una de las subidas, bajadas y tirabuzones emocionales de esta montaña rusa que es la tesis doctoral y, aún así, sigues a mi lado. Gracias por todo tu amor y paciencia, han sido infinitos, por no hablar de tu

ayuda informática en los momentos de verdadero pánico, ya sabes...imi héroe!, te quiero. A mis hermanos, Isaac y Aaron, gracias por todo. Seguramente no seáis conscientes, pero el simple hecho de pasar un rato juntos hace que mi cabeza se ponga a cero y mi batería se recargue al 100%, os adoro. Mamá, papá, no tengo palabras para agradeceros lo que habéis hecho por mí no solo estos años, sino toda mi vida. Sois la pieza clave en el rompecabezas, sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Por todo ello, qué mejor manera de formar parte de esto hasta el final que diseñar la fachada de esta tesis, la preciosa portada. Siempre preocupados por darme todos los medios a vuestro alcance (y los que no, también) para formarme como profesional y como persona, prometo compensar todo vuestro esfuerzo y dedicación dando lo mejor de mí. Os quiero.

Gracias a todos.

Abreviaturas y glosario	1
Resumen	5
Summary	11
Introducción	19
1 El biofilm	21
1.1 ¿Qué es el biofilm?.....	21
1.2 El biofilm en la cavidad oral.....	21
1.3 ¿De qué está compuesto el biofilm oral?	23
1.4 Formación y desarrollo del biofilm oral.....	25
1.5 Propiedades y estructura del biofilm oral.....	28
2 Implantes dentales osteointegrados	30
2.1 Antecedentes y evolución	30
2.2 Propiedades de los implantes.....	31
2.3 Complicaciones en implantología	34
3 Biofilm e implantes dentales: enfermedades peri-implantarias	35
3.1 ¿Qué son las enfermedades peri-implantarias?.....	35
3.2 Papel de las características de superficie de los implantes en el desarrollo de las enfermedades peri-implantarias	39
Justificación, objetivos e hipótesis.....	43
1 Justificación.....	45
2 Objetivos	46

2.1	Objetivo general.....	46
2.2	Objetivos específicos	46
3	Hipótesis	46
3.1	Hipótesis general.....	46
3.2	Hipótesis específicas	46
	Materiales y métodos	47
1	Fase I: Caracterización topográfica del crecimiento de un modelo <i>in vitro</i> de biofilm multiespecie sobre superficies de implantes dentales.....	49
1.1	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	49
1.2	Muestra de implante dental	50
1.3	Desarrollo del biofilm.....	50
1.4	Análisis de la biomasa y vitalidad del biofilm mediante Microscopía Confocal Láser de Barrido	51
1.5	Análisis morfológico del biofilm mediante Microscopía Electrónica de Barrido	53
1.6	Extracción de ADN y cuantificación de bacterias por Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa	53
1.7	Formación de biofilms sobre implantes soportados	55
1.8	Análisis estadístico	56
2	Fase II: Estudio <i>in vitro</i> de las diferencias en la formación del biofilm sobre implantes dentales con diferentes microtopografías de superficie	58
2.1	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	58
2.2	Muestras de implantes dentales.....	58

2.3	Desarrollo del biofilm.....	59
2.4	Análisis de la biomasa y vitalidad del biofilm mediante CLSM	60
2.5	Análisis morfológico del biofilm mediante MEB.....	61
2.6	Extracción de ADN y cuantificación de bacterias por qPCR.....	61
2.7	Análisis estadístico	61
Resultados		63
1	Fase I: Caracterización topográfica del crecimiento de un modelo <i>in vitro</i> de biofilm multiespecie sobre superficies de implantes dentales.....	65
1.1	Análisis por CLSM de la biomasa y viabilidad del biofilm	65
1.2	Análisis morfológico de las biopelículas por MEB	68
1.3	Evaluación Cuantitativa de Bacterias por qPCR.....	71
1.4	Reproducibilidad.....	76
1.5	Formación de biofilms sobre implantes soportados	76
2	Fase II: Estudio <i>in vitro</i> de las diferencias en la formación del biofilm sobre implantes dentales con diferentes microtopografías de superficie	79
2.1	Análisis por CLSM de la biomasa y viabilidad del biofilm	79
2.2	Análisis morfológico de las biopelículas por MEB	81
2.3	Evaluación Cuantitativa de Bacterias por qPCR.....	83
Discusión		87
1	Influencia de la macro y microtopografía del implante en la estructura, morfología y dinámica del biofilm oral	89
2	Influencia cuantitativa y cualitativa de la rugosidad superficial del implante dental en un biofilm maduro	94

3	Fortalezas y limitaciones de la investigación	98
4	Implicaciones de la investigación.....	100
Conclusiones.....		103
Bibliografía		107
Anexos		131
Artículo 1		133
Artículo 2.....		149

Abreviaturas y glosario

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AAP	Academia Americana de Periodoncia, siglas procedentes del inglés "American Academy of Periodontology"
BHI	Medio de cultivo rico en proteínas, siglas procedentes del inglés "Brain Heart Infusion"
CLSM	Microscopía Confocal Láser de Barrido, siglas procedentes del inglés "Confocal Laser Scanning Microscopy"
cQ	Ciclo de cuantificación, siglas procedentes del inglés "Quantification Cycle"
DE	Desviación estándar
EFP	Federación Europea de Periodoncia, siglas procedentes del inglés "European Federation of Periodontology"
IC	Intervalo de confianza
ICTS	Infraestructuras Científicas y Técnicas Singulares
kV	Kilovoltios
LT-SEM	Microscopía Electrónica de Barrido a baja temperatura, siglas procedentes del inglés "Low Temperature Scanning Electron Microscopy"
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
μL	Microlitros
μm²	Micrómetro cuadrado
μm³	Micrómetro cúbico
Min	Minutos

Abreviaturas

mL	Mililitro
mm	Milímetros
Nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NTC	Control sin muestra o control negativo, siglas procedentes del inglés " <i>non template control</i> "
PBS	Solución salina tamponada con fosfato, siglas procedentes del inglés " <i>Phosphate Buffered Saline</i> "
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en modalidad cuantitativa, siglas procedentes del inglés " <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> "
s	Segundos
Ti	Titanio
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Resumen



Estudio de biofilms orales sobre superficies de implantes dentales

Antecedentes y objetivos

El biofilm se describe como una comunidad de células bacterianas adheridas a una superficie viva o inerte inmersa en un medio acuoso y revestida por una capa protectora llamada matriz extracelular segregada por los propios microorganismos ayudándoles a mantenerse unidos.

Las superficies tanto de dientes como de implantes cumplen los requisitos indispensables para favorecer la formación de un biofilm oral. En el caso del diente, la formación de una microbiota subgingival supone la colonización de la superficie radicular por diferentes especies bacterianas. La presencia de las primeras bacterias, llamadas colonizadores primarios, favorece la aparición de nuevos colonizadores, los secundarios, dando como resultado un biofilm anaerobio gram-negativo.

Un patrón similar a lo ocurrido sobre la superficie dental parece darse en las superficies de titanio de los implantes dentales. En el caso de los implantes, la macrotopografía y la microtopografía (definida por la rugosidad) de las que se dotan a las diferentes superficies de implantes para beneficiar su osteointegración y conseguir el éxito en el tratamiento implantológico, pueden actuar como favorecedores de la adhesión de colonizadores primarios, desencadenando así la formación del biofilm.

Dada la implicación de las bacterias en el desarrollo de enfermedades peri-implantarias y teniendo en cuenta el aumento de su prevalencia, parece relevante el estudio del impacto de las características superficiales de implantes dentales de titanio sobre la formación del biofilm subgingival utilizando para ello un modelo *in vitro* de biofilm multiespecie sobre implantes de titanio en su forma comercial con su macro y microtopografía superficiales.

Resultados, discusión y conclusiones

En la presente investigación se estudió la influencia tanto de la macrotopografía como de la microtopografía superficiales de implantes dentales de titanio sobre la formación, el desarrollo y la disposición del biofilm subgingival a través de un modelo *in vitro* de biofilm multiespecie sobre superficies de implantes dentales en su forma comercial.

Durante la primera fase de la investigación, tras la incubación de los biofilms durante 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas sobre la superficie de titanio, pudo apreciarse como las bacterias colonizaron los implantes dentales desde las primeras horas del contacto bacteriano con la superficie. Los biofilms analizados alcanzaron su estado de madurez a las 96 horas, mostrando diferentes proporciones de células vivas/muertas dependiendo de su ubicación, siendo los picos de las espiras y las zonas laterales de éstas las que albergaron más bacterias vivas. Cuantitativamente, las densidades de cada bacteria fluctuaron en el tiempo, alcanzando sus máximas cifras a las 96 horas. A pesar de que los coeficientes de variación fueron altos, los porcentajes fueron similares a los publicados previamente con otras muestras de superficies de implantes en forma de discos.

En la segunda fase de la investigación, se llevó a cabo la evaluación de la formación del mismo modelo *in vitro* de biofilm multiespecie sobre implantes dentales de titanio en su forma comercial con diferentes microtopografías de superficie. Los resultados mostraron un biofilm bien consolidado, localizado principalmente en el pico y en el área lateral de la espira de las dos superficies en estudio, sin diferencias en la estructura del biofilm o disposición entre ellas. Cuantitativamente, sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de bacterias totales y, en particular, de *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, acumulándose mayores cantidades sobre los implantes de superficie de rugosidad moderada en comparación con los de rugosidad mínima.

De esta investigación pudo concluirse que tanto la micro como la macrotopografía de superficie de los implantes dentales de titanio afectan a la formación, estructura y disposición del biofilm bacteriano. Los implantes dentales utilizados en el modelo *in vitro* sufrieron una colonización bacteriana en un corto periodo de tiempo dando lugar a un biofilm maduro y bien estructurado. La viabilidad celular de los biofilms desarrollados fue diferente dependiendo de la localización en el seno de la macroestructura del implante siendo el pico de la espira la zona con mayor presencia de bacterias vivas y el valle, localizado entre las espiras del implante, la zona con mayor presencia de bacterias muertas, las cuales podrían comportarse como un reservorio nutricional para las células vivas.

Al mismo tiempo, ha podido concluirse que la microtopografía de superficie de los implantes dentales de titanio tiene consecuencias cuantitativas en la acumulación bacteriana. En la presente investigación, los biofilms multiespecie crecieron en ambas superficies de implantes en estudio, (rugosidad mínima y rugosidad moderada) sin diferencias estructurales o cualitativas significativas, sin embargo, cuantitativamente se obtuvo una biomasa significativamente mayor en los implantes de superficie de rugosidad moderada en comparación con los implantes de superficie de rugosidad mínima, incluidas algunas de las cepas más patógenas como *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Summary



Study of oral biofilms growing on dental implant surfaces

Background and objectives

Biofilm is described as a community of bacterial cells attached to a living or dead surface immersed in an aqueous environment, covered by a protective layer (secreted by the microorganisms themselves) helping them to stay together, called extracellular matrix.

The surfaces of both teeth and implants meet the essential requirements to favor the formation of the oral biofilm. In case of the teeth, the formation of a subgingival microbiota promotes the colonization of the root surface by different bacterial species. The presence of primary colonizers favors the arrival of new ones, called secondary colonizers, resulting in a gram-negative anaerobic biofilm.

A similar pattern to what happens on dental surfaces seems to occur on titanium dental implants surfaces. The macro and microtopography (defined by roughness) of dental implants that were developed to benefit their osseointegration, could also favor the adherence of primary colonizers, thus triggering biofilm formation.

Given the implication of oral bacteria in the development of peri-implant diseases and taking into account the increasement in the prevalence of this condition, it seems relevant to study and describe the formation of biofilm on whole titanium dental implants with their macro and microtopography, using an *in vitro* multispecies biofilm model.

Results, discussion and conclusions

The influence of macro and microtopography of titanium dental implants on the biofilm development and disposition was studied using an *in vitro* multispecies biofilm model on whole dental implants.

In first phase, after incubating biofilms for 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours on the titanium surface, it was possible to see how bacteria colonized the implant

Summary

surface from the very first hours of incubation. Analyzed biofilms reached their maturity stage at 96 hours, showing different proportions of living / dead cells depending on their location, being the peaks and the lateral zones of the threads, the areas harboring more living bacteria. Quantitatively, the densities of each bacteria fluctuated in time, reaching its maximum numbers at 96 hours. Although coefficients of variation were high, the percentages were similar to those previously published using different implant surface specimens, rather than whole dental implants.

In the second phase of the research, the formation of the same *in vitro* biofilm model used in the first phase was evaluated, this time on whole dental implants with different surface microtopographies. A consolidated biofilm was observed, located mainly in the peak and in the lateral area of the thread, on both surfaces under study, without differences in the structure or disposition of the biofilm between them. Quantitatively, statistically significant differences were found in the concentrations of total bacteria, *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, with higher amounts accumulating on moderate roughness surface compared to minimal roughness surface.

From this research, it was concluded that both micro and macrotopography of titanium dental implants have impact on the formation, structure and disposition of biofilm. Dental implants used in this *in vitro* model underwent a bacterial colonization in a short period of time developing a mature and well-structured biofilm. Cell viability of formed biofilms was different depending on the location within the implant macrostructure, being the peak of the thread the area with the highest presence of living bacteria, and the area between threads the area with the highest presence of dead bacteria, which could behave as a nutritional reservoir for living cells.

At the same time, it has been concluded that microtopography of titanium dental implant surfaces has quantitative and qualitative consequences on bacterial accumulation. In present research, multispecies biofilms grew on both minimal and moderate roughness implant surfaces, without significant structural or qualitative differences, however, quantitatively, dental implants with

moderate roughness surface accumulated more bacterial biomass, including some of the most pathogenic strains such as *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, than implants with minimal roughness surface.

Prefacio

La presente tesis doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos originales publicados en revistas científicas:

- Bermejo, P., Sanchez, M. C., Llama-Palacios, A., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2019). Topographic characterization of multispecies biofilms growing on dental implant surfaces: An in vitro model. *Clinical Oral Implants Research*, 30, 229-241. doi:10.1111/clr.13409
- Bermejo, P., Sanchez, M. C., Llama-Palacios, A., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. Biofilm formation on dental implants with different surface micro-topography: an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research*. doi: 10.1111/clr.13455. [Epub ahead of print]

Introducción



1 El biofilm

1.1 ¿Qué es el biofilm?

Más del 95 % de los microorganismos presentes en la naturaleza se encuentran adheridos a superficies, donde crecen formando biopelículas o biofilms (Costerton et al., 1995, Saini et al., 2011). El biofilm fue definido por Costerton (Donlan and Costerton, 2002) como “una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes”. Tal y como describe el autor, se ha observado que los microorganismos pertenecientes a un biofilm sufren una serie de adaptaciones fisiológicas y morfológicas en respuesta a los cambios ambientales mostrando un fenotipo alterado cuando son comparadas con sus homólogas en estado planctónico (Sanchez et al., 2011, Socransky et al., 1998, Haffajee et al., 2008, Overman, 2000).

Además de que los biofilms son ubicuos, pudiendo formarse prácticamente en toda aquella superficie que se encuentre inmersa en un medio acuoso, el desarrollo de éste puede darse particularmente rápido cuando las bacterias que lo componen tienen disponible un suministro regular de nutrientes gracias a la existencia de un sistema de flujo (Saini et al., 2011).

1.2 El biofilm en la cavidad oral

El microbioma humano, constituido por un ecosistema interno integrado a su vez por una comunidad de microorganismos, resulta fundamental para el mantenimiento de la salud del ser humano. La interacción entre estos microorganismos y el sistema inmunitario del huésped, proporcionan protección contra los patógenos contribuyendo de esta manera a la preservación de la salud (Samaranayake and Matsubara, 2017). La microbiología tradicional, basada

esencialmente en el cultivo bacteriano de laboratorio para la identificación de microorganismos mediante su aislamiento y clasificación según sus características morfológicas, bioquímicas y genéticas, no permite el cultivo de la mayoría de las células bacterianas observadas en la naturaleza por carecer de las condiciones o metodología adecuadas (Streit and Schmitz, 2004). En la actualidad, sin embargo, el empleo de la metagenómica permite secuenciar e identificar a las bacterias obteniendo secuencias del genoma de los diferentes microorganismos mediante la extracción y análisis de su ADN sin necesidad de cultivarlos (Bragg and Tyson, 2014). Utilizando el gen 16S rRNA como gen de referencia al considerarse el objetivo universal para la identificación bacteriana del ADN (Marin et al., 2018, Marin et al., 2017, Rosselli et al., 2016), y gracias a las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación y las herramientas bioinformáticas empleadas para el procesamiento de datos, se ha conseguido alcanzar un nivel de precisión en la taxonomía y función microbianas que ha revolucionado el conocimiento tanto del microbioma humano como de su participación en la salud o enfermedad del ser humano (Suarez Moya, 2017, Escobar-Zepeda et al., 2015).

La cavidad oral, con aproximadamente 700 especies procariotas diferentes identificadas gracias a las nuevas técnicas mencionadas, contiene el 25% del microbioma humano (Suarez Moya, 2017, Teles et al., 2013, McLean, 2014, Ferrer and Mira, 2016, Dewhirst et al., 2010).

En la saliva, las células bacterianas circulantes son consideradas como planctónicas, sin embargo, la cavidad oral cumple las condiciones necesarias para favorecer la adhesión y multiplicación de bacterias dando lugar a la formación del biofilm (Samaranayake and Matsubara, 2017). Estas condiciones son: superficies a las que adherirse (ya sea la superficie dental, material de reconstrucción o implante dental), inmersión en medio acuoso y un flujo constante de nutrientes (Saini et al., 2011).

El biofilm oral es un componente esencial involucrado en el desarrollo de la caries y de las enfermedades periodontales. Ambas patologías se encuentran entre las más prevalentes del ser humano con un impacto negativo en la calidad de vida siendo la principal causa de pérdida de dientes; por tanto, el conocimiento

de su composición y de las interacciones microbianas de las diferentes especies presentes en la cavidad oral es fundamental para el desarrollo de medidas preventivas y terapéuticas efectivas (Sanz et al., 2017, Do et al., 2013). Estudios recientes han descubierto nuevos mecanismos por los que la homeostasis entre huésped y microorganismo podría verse rota, favoreciendo la disbiosis y la aparición de periodontitis en pacientes susceptibles (Hajishengallis et al., 2011, Hajishengallis and Lamont, 2012, Darveau, 2010, Wade, 2011, Hajishengallis et al., 2012, Samaranayake and Matsubara, 2017). Las comunidades bacterianas disbióticas de patógenos claves en el desencadenamiento de la enfermedad, podrían presentar una virulencia sinérgica por la cual no sólo los patógenos serían capaces de tolerar la respuesta del huésped sino también de prosperar provocando la inflamación y destrucción de los tejidos (Orth et al., 2011, Hajishengallis, 2014).

1.3 ¿De qué está compuesto el biofilm oral?

Al observar y analizar microscópicamente el biofilm oral pueden percibirse en su composición tanto las células bacterianas distribuidas ordenadamente en microcolonias (15-20% del volumen) como la matriz extracelular rodeando a éstas (75-80% volumen) (Saini et al., 2011) (Figura 1). Esta matriz, conocida como glicocálix, está compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, material celular y sales minerales (Bowen et al., 2018).

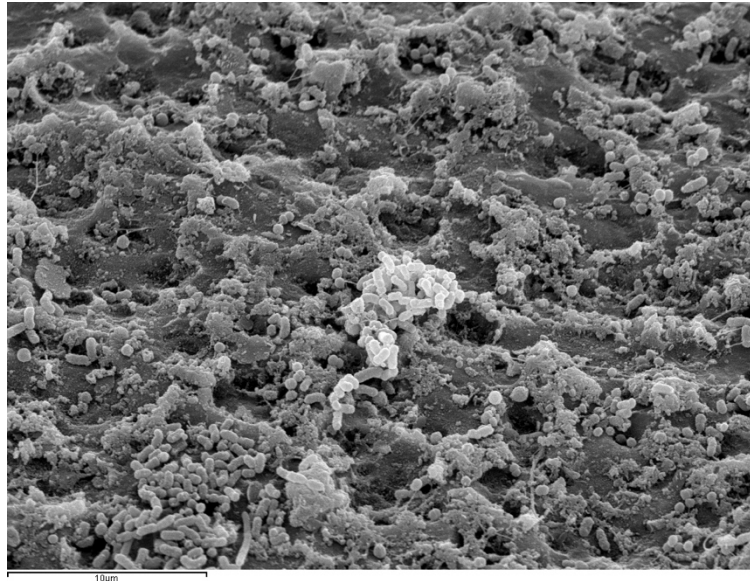


Figura 1. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de un biofilm bacteriano formado sobre la superficie de un implante dental de titanio. Se puede observar la matriz extracelular recubriendo la superficie y rodeando las bacterias organizadas en microcolonias.

Los exopolisacáridos, producidos por las propias bacterias del biofilm, constituyen el componente principal del glicocáliz y participan de manera fundamental en el desarrollo de la misma conservando la integridad del conjunto del biofilm (Jamal et al., 2018, Branda et al., 2005). Gracias a su composición y estructura, estas macromoléculas favorecen la adhesión entre ellas mismas y, a su vez, de las bacterias a la superficie. Los exopolisacáridos producidos por unas bacterias pueden ejercer como fuente de nutrientes para otras y de la misma forma, los exopolisacáridos pueden atrapar otros nutrientes del medio y ofrecerlos a las diferentes especies bacterianas presentes en el biofilm, suponiendo una ventaja para el desarrollo de este.

Además, entre las múltiples funciones de los exopolisacáridos, estos también ayudan con la retirada de desechos del medio favoreciendo el crecimiento bacteriano, y ofrecen protección a las bacterias impidiendo la acción de distintos antimicrobianos.

La pérdida o alteración de un determinado polisacárido puede alterar el biofilm pudiendo darse, incluso, la desaparición de este (Branda et al., 2005).

1.4 Formación y desarrollo del biofilm oral

El requisito fundamental para que ocurra la formación de un biofilm es la adhesión a una superficie sólida siendo ésta el primer paso en su desarrollo (Sjodin, 2019, Jamal et al., 2018). Por ello, la aptitud de unirse y mantenerse retenido en una superficie es una característica clave en la supervivencia de la mayoría de los microorganismos procariotas (Larsen and Fiehn, 2017).

El origen del biofilm puede darse de dos maneras diferentes: a partir de una célula planctónica o a partir de otro biofilm en desarrollo. Cuando se origina a partir de una célula planctónica ocurre gracias a que ciertas bacterias, conocidas como colonizadores iniciales o primarios (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* y *Actinomyces naeslundii*, entre otras), tienen la capacidad de desarrollar en su superficie estructuras conocidas como fimbrias o fibrillas. Las fimbrias consisten en largos filamentos proteicos que favorecen la adhesión de las células bacterianas a una superficie sólida (Saini et al., 2011, Tatakis and Kumar, 2005). A pesar de que las fimbrias son importantes para la adherencia inicial de las bacterias, se pueden encontrar otros factores que favorecen, sin ser requisitos indispensables, la adhesión bacteriana a una superficie. Ejemplos de ellos son la motilidad que muestran algunas especies bacterianas para alcanzar la superficie a colonizar contrarrestando las repulsiones hidrofóbicas o la expresión de adhesinas, proteínas que se desarrollan en la superficie celular, importantes para la fijación inicial de algunas especies bacterianas a las superficies sólidas (Nobbs et al., 2009, Marsh et al., 2016).

En la cavidad oral, las bacterias pueden adherirse a diferentes superficies, entre las que se incluyen superficies dentales, materiales de reconstrucción e implantes dentales (Larsen and Fiehn, 2017). Los diferentes factores físicos y químicos de estas superficies, tales como la rugosidad y la composición química, y factores asociados al medio en el que se desarrolla, como la composición química de la saliva y la velocidad del flujo, también influyen en la formación y adhesión del biofilm (Marsh et al., 2016).

Introducción

Una vez las bacterias se encuentran adheridas a una superficie sólida, ocurre su multiplicación y la coagregación con otras especies bacterianas dando lugar a microcolonias (Larsen and Fiehn, 2017)(Figura 2).

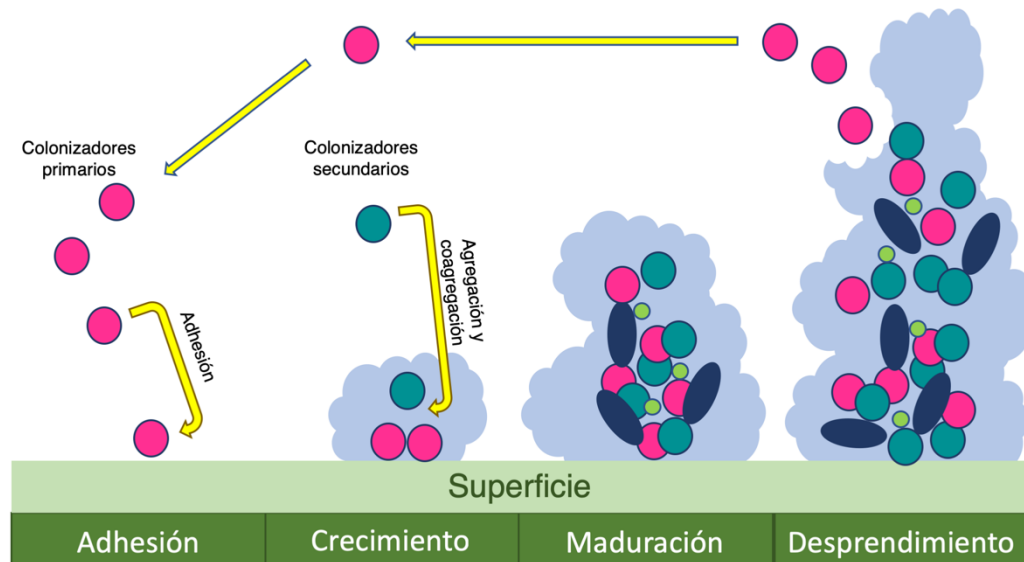


Figura 2. Esquema representativo de la formación del biofilm desde la adhesión de las primeras bacterias hasta su desprendimiento para la colonización de sitios nuevos.

La asociación de las bacterias en el seno del biofilm oral no es fortuito, sino que existen asociaciones definidas entre las diferentes especies bacterianas. En 1998, Socransky y colaboradores (Socransky et al., 1998) dirigieron un estudio en el que analizaron más de 13.261 muestras de placa subgingival procedente de 185 pacientes concluyendo la existencia de diferentes complejos bacterianos que incluían: colonizadores iniciales, tempranos, secundarios y tardíos. (Figura 3).

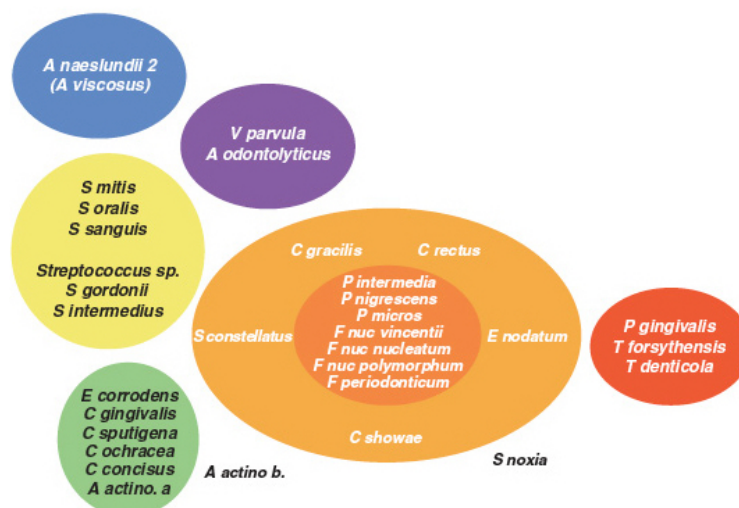


Figura 3. Esquema de los complejos bacterianos de Socransky sobre la asociación entre especies subgingivales. Se distinguen los complejos de especies que proliferan en estadios tempranos (colonizadores iniciales y tempranos, izquierda); colonizadores secundarios (complejo naranja) y colonizadores tardíos (complejo rojo) (Socransky et al. 1998).

La formación del biofilm y, por tanto, de la placa dental, ocurre gracias a ciertas relaciones interespecie que dan lugar a una colonización secuencial y repetitiva (Kolenbrander, 2011). De una manera resumida y basándonos en la definición de Kolenbrander de colonización secuencial (Kolenbrander, 2011), la presencia de colonizadores iniciales sobre una superficie, como son *Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*, ocasiona una interacción productiva con colonizadores tempranos, como *Veionella parvula*. Los colonizadores tempranos en general, y *Veionella parvula* en particular, parecen tener un amplio rango interactivo pudiendo crear combinaciones tanto con colonizadores iniciales como con colonizadores secundarios y tardíos, ejerciendo una influencia positiva en el éxito del crecimiento de las comunidades bacterianas. Esta propiedad de mejorar el crecimiento de la comunidad con un amplio abanico de especies resulta muy apropiada para un colonizador temprano, ya que él mismo coordina una sucesión de especies que colonizarán la superficie en cuestión (ya sea diente, material de restauración o implante).

A pesar de que *Streptococcus oralis* parece estar mucho más restringido en sus asociaciones, la asociación distintiva de *Streptococcus oralis* y *Veionella parvula*, dan lugar a la llegada de colonizadores secundarios como

Introducción

Fusobacterium nucleatum. Éste, a su vez, también exhibe una vasta gama de interacciones, favoreciendo la aparición de colonizadores tardíos como *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, los cuales se relacionan de manera conveniente con diversas especies que pertenecen a etapas anteriores de colonización, apoyando a la idea de colonización secuencial (Kolenbrander, 2011) (Figura 4).

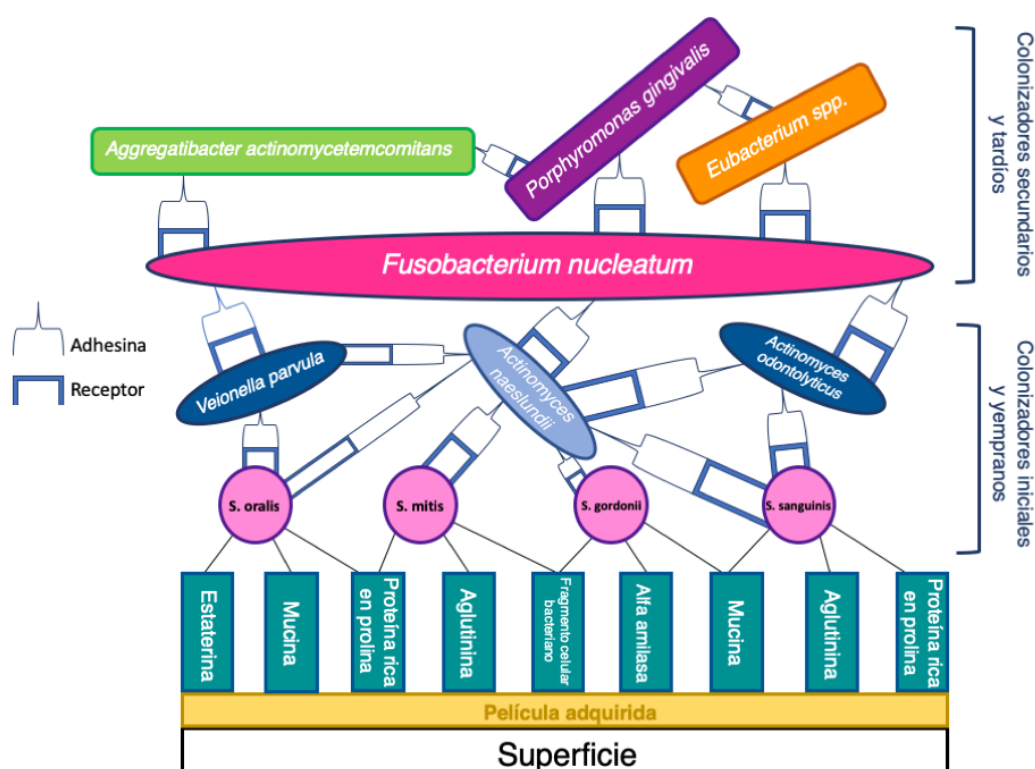


Figura 4. Modelo adaptado de Kolenbrander y col., (2011), en el que se muestran las relaciones interespecie y el modelo de colonización secuencial en la placa dental formada en el seno de la cavidad oral.

1.5 Propiedades y estructura del biofilm oral

La razón por la cual las bacterias se asocian en forma de biofilm es que consiguen adquirir una gran variedad de características que las sitúan en un estado ventajoso con respecto a sus homólogas planctónicas (Franklin et al., 2015, Carrouel et al., 2016, Tolker-Nielsen, 2015, Jamal et al., 2018, Lin, 2017). Formando parte del biofilm, las células bacterianas sufren una serie de variadas

adaptaciones fisiológicas y morfológicas como respuesta a los cambios ambientales provocados por variaciones de los gradientes de productos químicos, nutrientes y oxígeno a los que estos microorganismos deben adaptarse para garantizar su supervivencia. La recepción y el procesamiento de la información química del medio ambiente por parte de las bacterias es fundamental para la coordinación y dirección de las respuestas adaptativas (Solano et al., 2014, Tolker-Nielsen, 2015). Estas respuestas adaptativas favorecen la adecuación a la vida en el biofilm gracias a la regulación de un extenso conjunto de genes que confieren a las bacterias un fenotipo óptimo para el microambiente en el que viven que no presentan en su estado planctónico. Por todo ello es importante reconocer la placa dental como un biofilm en el entendimiento de la etiopatogenia de enfermedades orales tales como la caries, las enfermedades periodontales y las enfermedades peri-implantarias (Jamal et al., 2018, Lin, 2017).

Durante el desarrollo del biofilm se da una activa formación de capas de microorganismos fácilmente distinguibles debido a la disposición de las células bacterianas en crecimiento en microcolonias rodeadas por los polímeros extracelulares que secretan. Para poder garantizar la llegada de nutrientes y materias primas a las diferentes capas del biofilm, existe un sistema de transporte en forma de canales de agua que transcurren entre las diferentes microcolonias formando un sistema "circulatorio" primitivo que posibilita la difusión de nutrientes así como la eliminación de productos de deshecho (Herrling et al., 2017). La comunicación entre las bacterias en el biofilm es también inevitable para el desarrollo óptimo del colectivo de microorganismos. La comunicación celular bacteriana, llevada a cabo a través de la síntesis de moléculas de señalización química conocido como "*quorum sensing*", es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población (Solano et al., 2014, Whiteley et al., 2017, Abisado et al., 2018, Tolker-Nielsen, 2015).

La disposición de bacterias en microcolonias en el seno del biofilm dotan a este de una abundante gama de entornos de vida personalizados con pH y disponibilidad de nutrientes y oxígeno diferentes entre sí (Saini et al., 2011,

Kolenbrander, 2011, Jamal et al., 2018, Lin, 2017). Cada una de las microcolonias contiene miles de bacterias compatibles entre sí de manera que en cada una podrían encontrarse combinaciones diferentes de especies bacterianas. En el centro de una microcolonia, las bacterias pueden vivir en un ambiente estrictamente anaeróbico, mientras que las bacterias localizadas en las áreas de la microcolonia más próximas a los canales de flujo pueden vivir en presencia de oxígeno.

Por último, la supervivencia del biofilm a largo plazo tendrá más posibilidades de ser exitosa si además las bacterias colonizan sitios múltiples, desprendiéndose del biofilm formado y colonizando sitios nuevos (Tolker-Nielsen, 2015, Lin, 2017).

2 Implantes dentales osteointegrados

2.1 Antecedentes y evolución

En los comienzos de la implantología, los implantes dentales no fueron recibidos con credulidad por la comunidad científica y, sin embargo, su utilización para la rehabilitación de dientes ausentes no ha dejado de evolucionar desde hace más de 50 años. Las primeras investigaciones fueron llevadas a cabo en Suecia por Per-Ingvar Brånemark surgiendo de ellas el concepto de osteointegración al descubrir, por accidente, un mecanismo de adherencia de un metal al hueso (Branemark, 1983). Mientras Brånemark proseguía con sus estudios, investigaciones paralelas se dieron de manera independiente en Suiza, por Schroeder, y en Alemania, por Schulte, publicando sus primeros artículos sobre implantes anclados en hueso en la década de 1970 (Albrektsson et al., 2008). Sin embargo, los implantes osteointegrados no empezaron a considerarse como una opción válida de tratamiento hasta 1982 en Toronto, donde Brånemark presentó en una conferencia a nivel mundial la osteointegración y su implante de titanio en forma de tornillo, avalado por un seguimiento clínico de más de 10 años (Albrektsson et al., 2008, Atieh et al., 2010).

Los primeros resultados clínicos obtenidos por Brånemark fueron bastante pobres con tasas de éxito de alrededor de un 50%, que parecían confirmar que los materiales extraños introducidos en la cavidad oral no funcionaban, llegando a la conclusión de que probablemente un gran número de factores podrían influir en ello, entre otros, el riesgo de infección bacteriana. Por ello, se determinaron inicialmente una serie de factores a tener en cuenta como, por ejemplo, la biocompatibilidad del material y la naturaleza macro y microscópica del implante (Albrektsson et al., 1986).

Gracias al cambio en un gran número de parámetros (entre los que destacan cambios en el diseño del implante) los resultados clínicos obtenidos empezaron a mejorar de manera significativa. La importancia de conocer el trabajo de Brånemark reside en que de él surgió la obligatoriedad de comprender los aspectos biológicos, físicos y químicos del tratamiento implantológico para conseguir sus máximos beneficios.

Desde entonces y hasta hoy, el empleo de implantes dentales osteointegrados se ha generalizado en la práctica odontológica, convirtiéndose en tratamiento de referencia para la restauración tanto de la función como de la estética, en pacientes parcial o totalmente desdentados, todo ello con una alta predictibilidad a largo plazo (Berglundh et al., 2019, Smeets et al., 2016, Geckili et al., 2014).

2.2 Propiedades de los implantes

El material más ampliamente utilizado para la fabricación de implantes dentales es el titanio ya sea comercialmente puro (Ti) o aleaciones de éste. El uso del titanio como material de elección se debe principalmente a sus favorables propiedades mecánicas y a su excelente biocompatibilidad (Cordeiro and Barao, 2017, Quirynen et al., 2015).

En la primera década desde la aparición de los implantes, la superficie del mismo no fue considerada como un factor importante para la osteointegración del mismo; sin embargo, a partir de los años 80, gracias a Albrektsson (Albrektsson et al., 1981, Rupp et al., 2018), comenzaron a relacionarse las

características de superficie con una posible respuesta biológica al implante. Los dos sistemas de implantes dentales lanzados en los años 80 y 90 presentaban dos topografías de superficie distintas: el implante Branemark mínimamente mecanizado (Nobelpharma, Gotenborg, Suecia) y el Titanium Plasma Sprayed rugoso con microporos (Straumann, Basel, Suiza) (De Bruyn et al., 2017). Desde entonces, durante las últimas cuatro décadas, se han llevado a cabo diferentes modificaciones en la superficie del titanio con el fin de incrementar la osteointegración y, consecuentemente, de aumentar el éxito clínico tanto temprano como a largo plazo.

Estas modificaciones se han centrado principalmente en los parámetros físico-químicos de la superficie del implante, principalmente la rugosidad, la energía libre superficial y la humectabilidad, con el objetivo de favorecer la actividad de los osteoblastos, la síntesis de matriz extracelular y la mineralización ósea (Albrektsson and Wennerberg, 2004, Ferreira Ribeiro et al., 2016, Gutwein and Webster, 2004, Meirelles et al., 2007, Schwartz-Filho et al., 2012, Wennerberg et al., 2011, Wennerberg and Albrektsson, 2010).

De los diferentes parámetros de la superficie del implante, el que ha demostrado un mayor impacto en la aposición y maduración tempranas del hueso ha sido la microtopografía superficial, definida por la rugosidad, maximizando la interdigitación entre el hueso mineralizado y la superficie del implante (Le Guehennec et al., 2007). La rugosidad de la superficie puede verse descrita en términos de Ra , parámetro bidimensional, o preferiblemente en Sa , parámetro tridimensional (Wennerberg and Albrektsson, 2009).

En la literatura se ha sugerido la clasificación de la rugosidad de superficie en cuatro tipos (Albrektsson and Wennerberg, 2004): superficies lisas (valor de $S_a < 0,5 \mu\text{m}$), superficies mínimamente rugosas (S_a de $0,5-1 \mu\text{m}$) (Figura 5), superficies moderadamente rugosas ($S_a 1-2 \mu\text{m}$) (Figura 6), y superficies rugosas ($S_a > 2\mu\text{m}$).

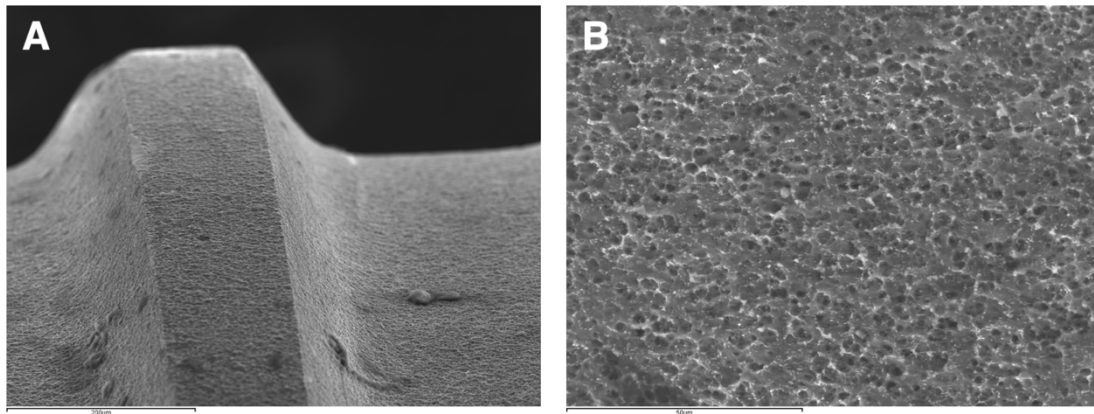


Figura 5. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de superficies de implantes de titanio de rugosidad mínima ($S_a \approx 0.5-1 \mu\text{m}$) que muestran la macrotopografía [A (200x) (escala=200 μm)] y la microtopografía [B (1000x) (escala=50 μm)] de la superficie del implante.

En la actualidad, más del 95 % de los sistemas de implantes disponibles presentan superficies compuestas de titanio o de aleaciones de titanio con superficies moderadamente rugosas (Teughels et al., 2006, Rasperini et al., 1998, Wu-Yuan et al., 1995).

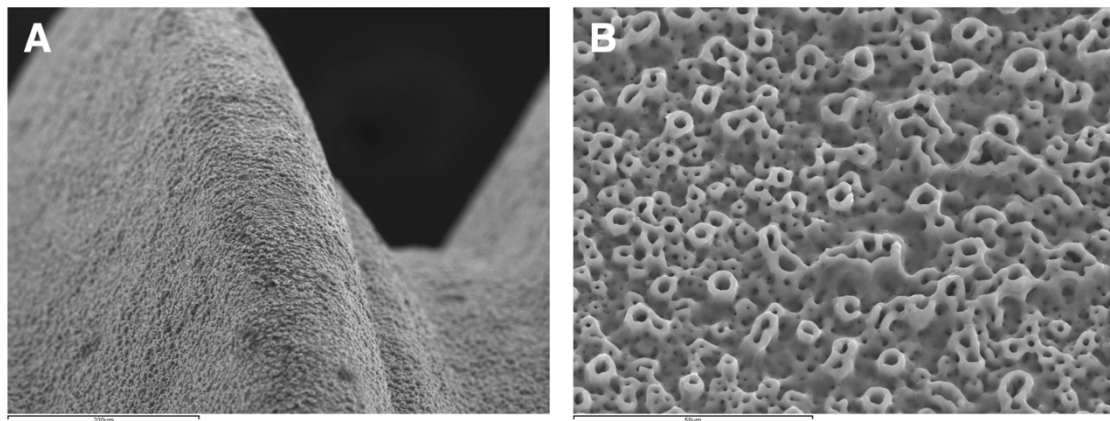


Figura 6. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de superficies de implantes de titanio de rugosidad moderada ($S_a \approx 1-2 \mu\text{m}$) que muestran la macrotopografía [A (200x) (escala=200 μm)] y la microtopografía [B (1000x) (escala=50 μm)] de la superficie del implante.

Los métodos de modificación de la superficie del implante se pueden dividir en procesos sustractivos y aditivos (Wennerberg and Albrektsson, 2009).

Básicamente, los métodos sustractivos eliminan material de la superficie del implante, mientras que los métodos aditivos lo agregan.

2.3 Complicaciones en implantología

A pesar del éxito y la alta predictibilidad de los que goza el tratamiento con implantes dentales osteointegrados, su utilización no está libre de complicaciones. Estas complicaciones, que pueden conducir incluso a la pérdida del implante, se clasifican en dos tipos dependiendo del momento en el que se producen:

1. Fracaso precoz o primario. Tienen una prevalencia de un 1-2 % (Chrcanovic et al., 2014) y reciben este nombre porque se trata de complicaciones que aparecen como consecuencia de un fallo en la osteointegración en los primeros meses tras la inserción del mismo. Factores de riesgo para este tipo de problemas son, por ejemplo, una condición anatómica pre-quirúrgica desfavorable del paciente (originando una estabilidad primaria del implante débil), una mala praxis odontológica y las características del implante utilizado (ya sea bien porque el tipo de implante seleccionado es inapropiado para el caso en particular, ya sea porque el implante era defectuoso) (Berglundh et al., 2002, Jepsen et al., 1996, Chrcanovic et al., 2014).

2. Fracaso tardío o secundario. Se trata de complicaciones que aparecen de manera tardía, años después de una exitosa osteointegración (Chrcanovic et al., 2014, Smeets et al., 2014). A su vez, según la causa de su aparición encontramos:

- a) Complicaciones mecánicas: su clínica cursa con movilidad del implante y posible dolor y aparece como consecuencia de fuerzas mecánicas excesivas (Sridhar et al., 2019).

- b) Complicaciones biológicas: se trata de la causa principal de fracaso tardío del implante y reciben en su conjunto el nombre de enfermedades peri-implantarias (Berglundh et al., 2018a, Sridhar et al., 2019, Schwarz et al., 2018).

3 Biofilm e implantes dentales: enfermedades peri-implantarias

3.1 ¿Qué son las enfermedades peri-implantarias?

A pesar de que han quedado demostradas altas tasas de supervivencia a largo plazo de los implantes dentales sin importar el sistema utilizado, los tejidos peri-implantarios no están exentos de sufrir cambios que lo dirijan desde el estado de salud peri-implantaria al estado de enfermedad (Klinge et al., 2018, Araujo and Lindhe, 2018, Lasserre et al., 2018).

Puesto que las enfermedades peri-implantarias son una complicación cada vez más prevalente (Sridhar et al., 2019, Schwarz et al., 2018, Derks and Tomasi, 2015), existe la necesidad de una clasificación de patologías y condiciones peri-implantarias que faciliten su prevención, diagnóstico y tratamiento.

Las primeras huellas sobre la definición y clasificación de las enfermedades peri-implantarias remontan al primer, sexto y séptimo Workshops de la Federación Europea de Periodoncia (EFP) (Albrektsson and Isidor, 1994, Berglundh et al., 2018a, Lang et al., 2011). Recientemente, en el año 2017, tuvo lugar el “*World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions*” en la ciudad de Chicago, Estados Unidos, organizado por la Academia Americana de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodoncia (EFP). Este workshop internacional, que reunió cerca de 120 expertos de todo el mundo, tenía como objetivo el de llegar a un consenso sobre la clasificación y definición de las condiciones peri-implantarias, entre otros. Previamente al Workshop, expertos de diferentes partes del mundo en la materia, llevaron a cabo una recopilación de datos sobre la evidencia científica acumulada en los últimos 20 años, redactando trabajos que servirían de base para los debates que se llevarían a cabo durante el workshop, al mismo tiempo que resumirían en un informe de consenso las diferentes clasificaciones y definiciones surgidas hasta entonces. Durante la celebración del mismo, se alzarían diferentes grupos de trabajo con misiones específicas quedando el grupo de trabajo 4, dirigido por Tord Berglundh y Gary Armitage (Berglundh et al., 2018a) al frente del debate sobre la clasificación y definición de “Enfermedades y condiciones peri-

implantarias”. Fruto del esfuerzo de este grupo de trabajo, vería la luz en el año 2018, un nuevo sistema de clasificación, en el que se destaca la presencia de salud peri-implantaria, mucositis peri-implantaria, peri-implantitis y otras condiciones peri-implantarias. Es importante además destacar que el término enfermedades peri-implantarias (mucositis y peri-implantitis) solo hace referencia a situaciones en la presencia de biofilm sobre las superficies de implantes es el principal factor etiológico asociado al desarrollo de la mucositis peri-implantaria y la peri-implantitis, dejando a un lado aquellas otras condiciones peri-implantarias, como pueden ser fracturas de implantes entre otras, que pueden simular o compartir clínica con las patologías peri-implantarias asociadas al biofilm (Berglundh et al., 2018b); aun así, (Berglundh, Armitage, Ávila-Ortiz y cols. 2018).

La salud peri-implantaria (Araujo and Lindhe, 2018) se caracteriza por la ausencia de eritema, sangrado al sondaje, hinchazón y supuración. Es por este motivo, que para el diagnóstico de salud peri-implantaria deben existir:

- Ausencia de signos clínicos de inflamación
- Ausencia de sangrado y/o supuración tras un sondaje cuidadoso
- Ausencia de incremento de la profundidad de sondaje en comparación con exploraciones previas.
- Ausencia de pérdida ósea progresiva (salvando aquellos cambios en los niveles óseos crestaes resultantes de la remodelación ósea inicial)

Debemos tener en cuenta que la profundidad de sondaje en un implante depende de la altura de los tejidos blandos con respecto a la localización de éste, por lo que no es posible definir unas mediciones de referencia compatibles con salud peri-implantaria, siendo de mayor importancia los signos clínicos de inflamación.

Sin embargo, la presencia bacteriana conlleva a una condición inflamatoria que da lugar a complicaciones biológicas del implante osteointegrado conocidas como enfermedades peri-implantarias: mucositis y

peri-implantitis (Berglundh et al., 2018b, Heitz-Mayfield et al., 2011, Schwarz et al., 2018)

Estas enfermedades tienen una alta prevalencia presentando una media del 43 % (cifras que oscilan entre un 19-65 %) en el caso de la mucositis y una media del 22 % (cifras entre el 1-47 %) en el caso de la peri-implantitis (Derks and Tomasi, 2015).

La mucositis peri-implantaria ha sido definida en el Workshop Mundial de la Academia Americana de Periodoncia y de la Federación Europea de Periodoncia (2017) como la inflamación de la mucosa peri-implantaria sin pérdida de hueso circundante que aparece tras la acumulación de bacterias alrededor de un implante osteointegrado (Berglundh et al., 2018b). Los signos clínicos con los que cursa esta inflamación son el sangrado al sondaje, que puede ir acompañado de eritema y supuración (Jepsen et al., 2015, Berglundh et al., 2018b). Existen pruebas sólidas de estudios preclínicos *in vivo* (Schwarz et al., 2014, Schou et al., 2002, Zitzmann et al., 2002) y humanos (Chan et al., 2019, Meyer et al., 2017, Ramanauskaite et al., 2018) confirmando la placa dental como factor etiológico principal de la mucositis quedando descartada la posibilidad de la aparición de mucositis no inducida por bacterias. Esta patología puede resolverse de manera relativamente sencilla con una restitución de la higiene y control del biofilm bacteriano con plazos de hasta tres semanas curación (Berglundh et al., 2018a, Caton et al., 2018, Tonetti et al., 2015).



Figura 7. Imagen de mucosa peri-implantaria con signos de mucositis: sangrado y eritema.

A pesar de que la causa principal de la mucositis es la formación del biofilm, existen ciertos indicadores de riesgo que pueden alterar la respuesta del paciente a la presencia bacteriana, como son el tabaco, la diabetes y radioterapia (Berglundh et al., 2018b, Pimentel et al., 2018).

Por otro lado, la peri-implantitis ha quedado definida como una enfermedad de los tejidos que rodean los implantes dentales asociada a la placa bacteriana caracteriza por la presencia de inflamación en la mucosa peri-implantaria y una pérdida progresiva del hueso de soporte (Schwarz et al., 2018, Berglundh et al., 2018b). Los signos clínicos de dicha condición son síntomas de inflamación, sangrado al sondaje y / o supuración, aumento en la profundidad del sondaje y / o recesión del margen mucoso, al mismo tiempo que se identifica la pérdida de hueso de soporte radiográficamente (Figura 8).

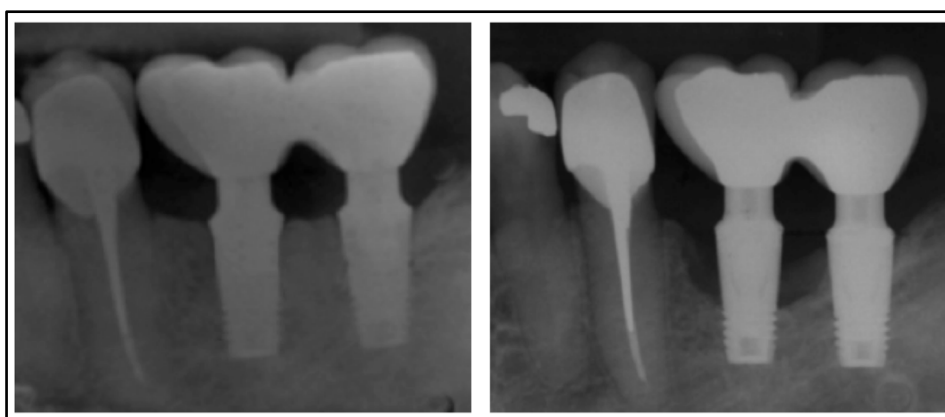


Figura 8. Imagen radiográfica representativa de la pérdida de inserción ósea de un implante dental.

La peri-implantitis es una patología asociada a la placa existiendo evidencia científica de que pacientes con un control deficiente de placa y una falta de seguimiento regular tienen mayor riesgo de desarrollarla (Schwarz et al., 2018). A pesar de que se trata de una condición patológica inflamatoria asociada a la presencia bacteriana, no hay evidencia científica de la existencia de bacterias específicas ni de citoquinas proinflamatorias atribuibles a la peri-implantitis

(Lasserre et al., 2018). Sin embargo, sí existen datos sobre la relación entre el diagnóstico de mucositis peri-implantaria y el desarrollo de peri-implantitis (especialmente en ausencia de un mantenimiento regular) (Jepsen et al., 2015). Existe, además, un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en pacientes con antecedentes de enfermedad periodontal, mal control de la placa, y ausencia de mantenimiento regular (Isler et al., 2019).

3.2 Papel de las características de superficie de los implantes en el desarrollo de las enfermedades peri-implantarias

A pesar del beneficio clínico demostrado de las superficies modificadas de implantes en el grado de osteointegración, investigaciones científicas sugieren que la rugosidad de superficie puede jugar un papel clave en el desarrollo de la peri-implantitis (De Bruyn et al., 2017). Polizzi y colaboradores (Polizzi et al., 2013) compararon de manera retrospectiva implantes de rugosidad mínima con implantes de rugosidad moderada mostrando que, si bien los implantes moderadamente rugosos demostraron tener tras 10 años una tasa de supervivencia mayor en comparación con los de rugosidad mínima, también se vieron afectados en mayor grado por peri-implantitis.

Durante la colocación del implante en la cavidad oral su superficie se encuentra estéril, sin embargo, cuando los componentes transmucosos quedan expuestos al entorno oral, son susceptibles de sufrir una colonización bacteriana al igual que ocurre con los dientes y con otras superficies artificiales utilizadas en odontología tales como restauraciones dentales y prótesis. En esta situación, se favorece la formación de la película adquirida sobre la superficie expuesta que será rápidamente colonizada por bacterias dando lugar al biofilm (Figura 9).

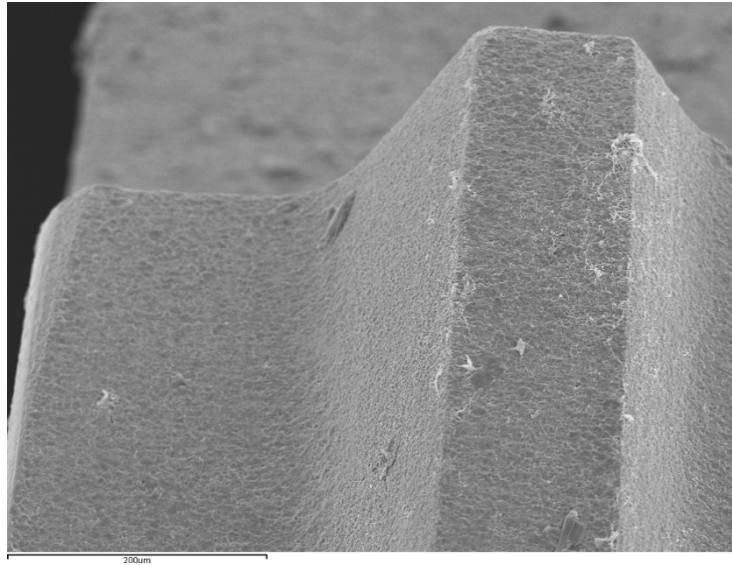


Figura 9. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (200x) (escala=200 μm) que muestra la superficie de un implante, inicialmente estéril, cubierta por biofilm una vez expuesta a la presencia bacteriana.

Inicialmente, este biofilm está compuesto por bacterias compatibles con la salud peri-implantaria pero, por el contrario, si se les permite crecer y madurar, se dan una serie de cambios cuantitativos y cualitativos tanto en la composición como en la virulencia del biofilm formado, desencadenando una respuesta inmunoinflamatoria en los tejidos peri-implantarios pudiendo dar lugar a la aparición de enfermedades peri-implantarias (Ferreira Ribeiro et al., 2016).

Puesto que el factor clave en la iniciación de las enfermedades peri-implantarias es la formación de biofilm sobre la superficie del implante expuesta, existe un gran interés científico en el estudio de la capacidad bacteriana a adherir a los diferentes tipos de superficies de implantes y formar biofilms complejos.

En la actualidad existe una amplia gama de superficies de implantes disponibles sometidas a diferentes factores químicos y físicos que, aplicados sobre la superficie del implante, le dotan de una rugosidad favorecedora de una mayor osteointegración. Se han desarrollado topografías específicas de superficie con aumentos de la rugosidad relativa y la hidrofobicidad para mejorar las interacciones implante-tejido. Estas topografías de superficie complejas, que mejoran claramente la osteointegración del implante aumentando la

probabilidad de éxito en el tratamiento implantológico podrían, a su vez, facilitar la adhesión y desarrollo de biofilms bacterianos complejos además de perjudicar a la capacidad de eliminarlos en comparación con las superficies de titanio pulidas. Todo ello favorecería una pérdida de equilibrio entre la exposición a las bacterias y la respuesta del huésped conduciendo a la inflamación y el desarrollo de enfermedades peri-implantarias (Ferreira Ribeiro et al., 2016, Di Giulio et al., 2016, Song et al., 2015, Violant et al., 2014, Xing et al., 2015).

Previas investigaciones *in vitro* sobre superficies de implantes han demostrado que la rugosidad, la energía libre de la superficie, la humectabilidad y el grado de esterilización pueden afectar a la formación del biofilm, la distribución tridimensional bacteriana y la eficacia del tratamiento antimicrobiano (Di Giulio et al., 2016, Lin et al., 2013, Yeo et al., 2012, Song et al., 2015, Schmidlin et al., 2013, Al-Ahmad et al., 2010). De las diferentes características superficiales de los implantes, se ha observado que la rugosidad es la que mayor impacto tiene en la formación de biofilm (Teughels et al., 2006, Schmidlin et al., 2013).

A día de hoy, las muestras utilizadas para el estudio de la relación entre la superficie del implante y la colonización bacteriana, han consistido en discos o bloques de titanio que simulan la superficie en estudio (Aguayo et al., 2015, de Avila et al., 2015, Di Giulio et al., 2016, Papavasileiou et al., 2015, Pita et al., 2015, Ready et al., 2015) pero que no aportan las características macroestructurales y topográficas de los implantes dentales utilizados en la práctica clínica (Pereira et al., 2015, Schmidt et al., 2017, Sridhar et al., 2016).

Justificación, objetivos e hipótesis

1 Justificación

El factor clave en el inicio de las enfermedades peri-implantarias es la respuesta inflamatoria asociada a la presencia bacteriana en las superficies expuestas del implante, por lo que existe un gran interés científico en estudiar la capacidad de las bacterias para adherirse a las diferentes superficies de implantes y formar biofilms complejos. Además, resulta de interés conocer el grado de implicación de las características superficiales del titanio (concretamente de la rugosidad) en la formación y acumulación bacterianas.

A pesar de la presencia en la literatura de numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* de la relación existente entre las características superficiales del implante y la formación del biofilm, aún sigue existiendo cierta controversia sobre esta relación en la actualidad. La mayor parte de los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados hasta la actualidad han utilizado muestras en sus investigaciones tales como discos, que contienen la superficie de titanio estudiada pero que carecen de las características macroestructurales y topográficas de los implantes dentales utilizados en la práctica clínica.

Teniendo en cuenta la dificultad que supone la investigación del biofilm oral *in vivo*, así como conseguir un modelo bacteriano reproducible desde placa recogida de pacientes, se ha considerado de interés estudiar el impacto de la macro y microtopografía superficiales de implantes dentales de titanio sobre el biofilm subgingival a través de un modelo de biofilm oral *in vitro*, de fácil manejo y reproducible, en el que se incluyan colonizadores iniciales (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*), formado sobre superficies de implantes dentales en su forma comercial. Estas investigaciones ofrecerían información sobre la dinámica de formación, estructura y disposición bacterianas sobre la superficie de implantes dentales con su macro y microestructura, así como las consecuencias cuantitativas y cualitativas en la acumulación bacteriana del grado de rugosidad superficial.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Estudiar la colonización secuencial y estructura del biofilm subgingival en la superficie de implantes dentales utilizando para ello un modelo *in vitro* de biofilm multiespecie sobre superficies de implantes dentales en su forma comercial.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudiar el impacto de la macro y microtopografía superficiales de implantes dentales de titanio en la formación del biofilm subgingival evaluando la acumulación bacteriana en el tiempo y la estructura y disposición del biofilm en distintas zonas topográficas.

2. Estudiar el impacto de la microtopografía superficial de implantes dentales de titanio en la formación del biofilm subgingival evaluando las diferencias en la estructura y acumulación del biofilm en implantes dentales con diferente grado de rugosidad.

3 Hipótesis

3.1 Hipótesis general

La superficie de los implantes dentales de titanio afecta a la colonización bacteriana y a la estructura del biofilm subgingival.

3.2 Hipótesis específicas

1. La micro y macrotopografía de superficie de implantes dentales de titanio afectan a la formación, estructura y disposición del biofilm bacteriano.

2. La microtopografía de superficie de implantes dentales de titanio tiene consecuencias cuantitativas y cualitativas en la acumulación bacteriana

Materiales y métodos

1 Fase I: Caracterización topográfica del crecimiento de un modelo *in vitro* de biofilm multiespecie sobre superficies de implantes dentales

1.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron cepas estándar de *S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Tanto las cepas como las referencias de la colección de cultivo a la que pertenecen se muestran en la tabla 1.

Cepa	Referencia
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT 907T ¹
<i>Veionella parvula</i>	NCTC 11810 ²
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC 19039 ³
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DMSZ 20482 ⁴
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ 8324

¹CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

²NTCT, National Collection of Type Cultures

³ATCC, American Type Cultures Collection

⁴DMS, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen

Tabla 1. Cepas seleccionadas en el estudio y colección de cultivo tipo

Cada cepa bacteriana fue cultivada de manera individual en placas agar sangre (Blood Agar No 2; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementadas con un 5% de sangre de caballo (Oxoid), 5,0 mg/L de hemina (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) y 1,0 mg/L de menadiona (Merck, Darmstadt, Alemania) en

Materiales y métodos

condiciones de anaerobiosis (10% H₂ y 10% CO₂ equilibrados con N₂) a 37°C durante 24-72 horas.

1.2 Muestra de implante dental

Para esta fase de la investigación se seleccionaron muestras de implantes estériles de titanio comercialmente disponibles 3i Full OSSEOTITE® Certain® (Implant Innovations, Inc. 4555 Riverside Drive, Plam Beach Gardens, Florida, Estados Unidos), de 10 mm de longitud y 3,25/3,4 mm de diámetro, con superficie patentada sometida a arenado y grabado ácido.

1.3 Desarrollo del biofilm

Con el objetivo de estandarizar las condiciones del estudio y de favorecer la reproducibilidad del modelo, inoculando una concentración constante de cada una de las cepas bacterianas en cada uno de los ensayos, el desarrollo del biofilm sobre la superficie del implante se llevó acabo siguiendo el protocolo puesto a punto en el Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid y publicado por el grupo de investigación ETEP (Etiología y Tratamiento de las Enfermedades Periodontales) (Sanchez et al., 2011).

La metodología consistió en realizar cultivos puros de cada bacteria (a partir de los cultivos frescos conseguidos en las placas de agar sangre) en condiciones de anaerobiosis en medio BHI (por sus siglas en inglés, *Brain Heart Infusion*) modificado, durante 24-48 horas. El medio BHI modificado consiste en un medio de cultivo rico en proteínas que contiene BHI (Becton, Dickinson and Company, Franflin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) suplementado con 2,5 g/L de mucina (Oxoid), 1,0 g/L de extracto de levadura (Oxoid), 0,1 g/L de cisteína (Sigma), 2,0 g/L de bicarbonato de sodio (Merck), 5,0 mg/L de hemina (Sigma), 1,0 mg/L de menadiona (Merck) y 0,25% (v/v) de ácido glutámico. Pasado el tiempo de incubación, en cada cultivo puro de cada bacteria se midió la fase media exponencial por espectrofotometría, para realizarse posteriormente diluciones seriadas en tubos Eppendorf que contenían 900 mL de PBS estéril (por sus siglas en inglés, *Phospate Buffered Saline*) hasta obtener 1 mL de cada una de

las bacterias que contuvieran 10^3 unidades formadoras de colonia (UFC)/mililitro (mL) para *S. oralis*, 10^5 UFC/ml para *A. naeslundii* y *V. parvula*, y 10^6 UFC/mL para *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Por último, en un tubo Falcon se procedió a la combinación de las 6 especies bacterianas para obtener la mezcla utilizada para el desarrollo del biofilm.

Cada uno de los implantes estériles fue colocado en un pocillo de una placa de cultivo tisular multipocillo (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) e inoculado con 1,5 mL de la mezcla bacteriana con concentraciones conocidas de cada bacteria en suspensión. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis para permitir el crecimiento bacteriano ($10\% \text{ H}_2$ y $10\% \text{ CO}_2$ equilibrados con N_2) durante 12, 24, 48, 72, 96 o 120 horas. Para evitar contaminaciones no deseadas, en las mismas placas también se sometieron a incubación pocillos que contenían únicamente medio de cultivo BHI modificado.

1.4 Análisis de la biomasa y vitalidad del biofilm mediante Microscopía Confocal Láser de Barrido

Para el análisis de la morfología del biofilm mediante Microscopía Confocal Láser de Barrido o CLSM (por sus siglas en inglés, *Confocal Laser Scanning Microscopy*), se utilizó el microscopio confocal Olympus® FV1200 (Olympus Iberia, Barcelona, España). Antes del análisis por CLSM, los implantes fueron secuencialmente aclarados en tres ocasiones con 2 mL de PBS [tiempo de inmersión por aclarado, 10 segundos (s)] con el fin de eliminar las posibles bacterias no adheridas.

Con el fin de diferenciar las bacterias vivas de las muertas, cada implante fue sometido a tinción con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes B. V., Leiden, Países Bajos) a temperatura ambiente. Este kit se usa para monitorizar la viabilidad de poblaciones bacterianas en función de la integridad de la membrana de la célula y consta de dos fluorocromos: SYTO9® y Ioduro de propidio. Por un lado, SYTO9® tiñe los ácidos nucleicos en verde tanto de bacterias gram positivas como gram negativas, tanto vivas como muertas; sin embargo, el ioduro de propidio es un agente

intercalante que tiene la capacidad de teñir de rojo el ADN bacteriano tan sólo de las células muertas al no poder atravesar la membrana de las células vivas. Por ello, tras la tinción, finalmente podrán distinguirse las bacterias vivas (en verde) de las bacterias muertas (en rojo). La proporción utilizada de los fluocromos fue de 1:1 y el tiempo de tinción de 9 ± 1 minuto para obtener la señal de fluorescencia óptima para las correspondientes longitudes de onda [SYTO9 ®, 515-530 nanómetros (nm); Ioduro de propidio, >600 nm].

El software del microscopio Olympus se configuró para tomar imágenes de 1,16 micras (μm) de grosor (12 bits, 1024×1024 píxeles). A su vez, las colecciones de imágenes obtenidas fueron analizadas con tres tipos diferentes de software:

- El software Imaris 7.7.0® (Bitplane, Zurich, Suiza) para la reconstrucción tridimensional a partir de los cortes obtenidos por el microscopio. Para el análisis de la superficie del implante se seleccionaron tres áreas diferentes y representativas: a) la espira del implante, b) el área entre espiras y c) el pico de la espira del implante, analizándose al menos tres muestras para cada tiempo de incubación en estudio (12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas).
- El software Fiji (Image J, versión 2.0-rc-65/1.52b, software de procesamiento de imágenes de código abierto) para evaluar la proporción de bacterias vivas/muertas (es decir, el área ocupada por las células vivas dividida por el área ocupada por células muertas).
- El software COMSTAT (disponible como software gratuito en www.comstat.uk) para el cálculo de la biomasa en micras³/micras² ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) de las imágenes obtenidas por CLSM a los diferentes tiempos de incubación.

Los análisis se realizaron en el Centro Nacional de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Campus de Moncloa, Universidad Complutense de Madrid, España).

1.5 Análisis morfológico del biofilm mediante Microscopía Electrónica de Barrido

Antes de proceder al análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), los implantes fueron aclarados secuencialmente en tres ocasiones cada uno con 2 mL de PBS estéril (tiempo de inmersión por aclarado, 10 s) con el fin de eliminar las posibles bacterias no adheridas. Tras el aclarado, los implantes se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% (Panreac Química, Barcelona, España) y glutaraldehído al 2,5% (Panreac Química) durante 4 horas a 4°C. Las muestras de implantes fueron aclaradas de nuevo en esta ocasión en PBS y, posteriormente, en agua estéril [tiempo de inmersión por aclarado, 10 minutos (min)]. Tras el aclarado, cada implante se sometió a deshidratación mediante una serie de soluciones de alcohol con gradaciones crecientes (30, 50, 70, 80, 90 y 100%; tiempo de inmersión por solución, 10 min). Una vez las muestras se encontraron deshidratadas, se procedió a su secado en punto crítico, se recubrieron por pulverización con oro y se analizaron mediante el microscopio JSM 6400 (JSM6400, JEOL, Tokio, Japón), con un detector de electrones de dispersión posterior y una resolución de imagen de 25 kilovoltios (kV). Para esta fase de la investigación se analizaron al menos tres muestras por cada tiempo de incubación en estudio. Los análisis se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica de las ICTS (Infraestructuras Científicas y Técnicas Singulares) (Campus de Excelencia Internacional de Moncloa, Universidad Complutense, Madrid, España).

1.6 Extracción de ADN y cuantificación de bacterias por Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa

Antes de proceder a la extracción de ADN, los implantes fueron aclarados secuencialmente en tres ocasiones cada uno en una solución de PBS estéril (tiempo de inmersión por aclarado, 10 s) con el fin de eliminar posibles bacterias no adheridas.

Para proceder a la extracción del ADN, los biofilms fueron disgregados sometiendo a los implantes a vórtex a temperatura ambiente, durante 2 min en 1

mL de PBS estéril. El ADN fue aislado mediante la aplicación del kit comercial MolYsisComplete5 (Molzym GmbH & CoKG, Bremen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante (el protocolo para la extracción de ADN bacteriano se siguió desde el paso 6, evitando los pasos preliminares).

El ADN extraído se analizó y cuantificó mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) con sondas de hidrólisis de nucleasa 5'. Los cebadores y sondas fueron proporcionados por Life Technologies Invitrogen (Carlsbad, California, Estados Unidos), Applied Biosystems (Carlsbad, California, Estados Unidos) y Roche (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemania) y fueron dirigidos contra el gen 16S rRNA (Marin et al., 2018, Marin et al., 2017).

La amplificación por qPCR se realizó en un volumen de mezcla de reacción total de 10 microlitros (μL). Las mezclas de reacción contenían 5 μL de mezcla maestra 2x (LC 480 Probes Master, Roche), concentraciones óptimas de cebadores y sonda (900, 900 y 300 nanomolar (nM) para *S. oralis*; 300, 300 y 300 nM para *A. naeslundii* y *P. gingivalis*; 750, 750 y 400 nM para *V. parvula*; 300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*; y 600, 600 y 300 nM para *F. nucleatum*), y 2 μL del ADN bacteriano extraído. Como control negativo se utilizó 2 μL de agua estéril (NTC, por sus siglas en inglés, *non-template control*) (Water PCR grade, Roche).

Las muestras se sometieron a un ciclo inicial de amplificación de 95°C durante 10 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Los análisis se realizaron con el termociclador LightCycler® 480 II (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemania). Las placas utilizadas en el estudio fueron FramStar 480 de marco natural y pocillos blancos (4titude; The North Barn, Damphurst Lane, Reino Unido), selladas por sellos transparentes adhesivos QPCR (4titude).

Cada muestra de ADN bacteriano fue analizada por duplicado. Los valores del ciclo de cuantificación (Cq, por sus siglas en inglés, *Quantification Cycle*) se

determinaron utilizando el software provisto con el termociclador (LC 480 Software 1.5, Roche). Este protocolo se repitió en tres experimentos independientes, cada uno con tres muestras de implantes incubados a 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas (n=9 para cada tiempo de incubación).

1.7 Formación de biofilms sobre implantes soportados

Se fabricaron cubos de metacrilato, de 10 milímetros (mm) de anchura y 7 mm de altura con un fresado interno de 2,7 mm de diámetro y 5 mm de profundidad como soporte para los implantes en una posición fija permitiendo la exposición de la mitad coronal de la superficie del implante (Figura 10). Los implantes fueron roscados en los cubos de metacrilato estériles y emplazados cada uno en un pocillo de una placa de cultivo tisular multipocillo (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) para ser inoculados con 1,5 mL de la misma mezcla bacteriana con concentraciones conocidas de cada bacteria en suspensión. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis para permitir el crecimiento bacteriano (10% H₂ y 10% CO₂ equilibrados con N₂) durante 96 horas. Para evitar contaminaciones no deseadas, en las mismas placas también se sometieron a incubación pocillos que contenían únicamente medio de cultivo BHI modificado.

Este protocolo fue repetido en tres experimentos independientes, cada uno con tres réplicas de implantes dentales sujetos por los cubos de metacrilato (n=9).



Figura 10. Imagen correspondiente al dispositivo de metacrilato, de 10 mm de ancho y 7 mm de alto con una perforación interna de 2,7 mm de diámetro y 5 mm de profundidad para el soporte de los implantes en una posición fija que permite la exposición del tercio coronal de la superficie del implante.

1.8 Análisis estadístico

Para el análisis por qPCR, la variable resultado principal fue la concentración de cada bacteria (UFC/mL) en cada tiempo de incubación (12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas), de manera independiente. Se llevó a cabo el análisis para cada parámetro en estudio ($n=9$), haciendo comparaciones entre los tiempos de incubación. Para evaluar la normalidad de la muestra se realizó la prueba de la normalidad de Shapiro-Wilk y la distribución de datos. Los datos se expresaron como medias y desviaciones estándar (DE). Con el fin de comparar la evolución de cada bacteria empleada a lo largo del tiempo, se empleó el análisis de la varianza de una vía con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideraron como estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

El software empleado para el análisis de todos los datos fue IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, Estados Unidos).

La reproducibilidad del biofilm sobre superficies de implantes dentales fue calculada y comparada con biofilms desarrollados sobre discos de hidroxiapatita, titanio y zirconio (Sanchez et al., 2014). Para ello, se usaron coeficientes de variación con respecto a los resultados obtenidos por qPCR [medias y desviaciones estándar (DE) de las UFC/mL de cada una de las seis bacterias empleadas].

2 Fase II: Estudio *in vitro* de las diferencias en la formación del biofilm sobre implantes dentales con diferentes microtopografías de superficie

2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de la segunda fase de las investigaciones, las cepas bacterianas empleadas fueron las mismas que en la primera fase del estudio: *S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Las cepas con las referencias de la colección de cultivo a la que pertenecen se muestran en la tabla 1 citada con anterioridad en el apartado de descripción de las cepas bacterianas y condiciones de cultivo de la fase I.

Cada cepa bacteriana fue cultivada en placas agar sangre (Blood Agar No 2; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementadas con 5% de sangre de caballo (v/v) (Oxoid), 5,0 mg/L de hemina (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) y 1,0 mg/L de menadiona (Merck, Darmstadt, Alemania) en condiciones de anaerobiosis (10% H₂ y 10% CO₂ equilibrados con N₂) a 37°C durante 24-72 horas.

2.2 Muestras de implantes dentales

Para la segunda fase de la investigación se seleccionaron muestras estériles de implantes dentales de titanio con diferente microtopografía de superficie:

- Implantes de rugosidad mínima 3i Full Certain®, de 10 mm de longitud y 3.25/3.4 mm de diámetro (Implant Innovations, Inc. 4555 Riverside Drive, Palm Beach Gardens, Florida. Estados Unidos). Estos implantes presentan una superficie sometida a grabado ácido patentada (Osseotite®) con una rugosidad superficial de $S_a \approx 0.5-1 \mu$. Los implantes 3i Full OSSEOTITE® Certain® implants presentan un paso de rosca de 0,6 mm, un cuerpo roscado de 8,5 mm de longitud variando su diámetro entre 3,3 y 3,4 mientras que el diámetro del ápice es de 2,6 mm.

- Implantes de rugosidad moderada Nobel Biocare Brånemark System® Mk III Groovy RP, de 10 mm de largo y 3.75 mm de diámetro (Nobel Biocare AB,

SE-40226, Goteburgo, Suecia). Estos implantes presentan una superficie patentada (TiUnite®) que se caracteriza por una capa de óxido de titanio gruesa y moderadamente rugosa con un alto grado de cristalinidad enriquecida con fósforo ($S_a \approx 1-2 \mu$). Los implantes Nobel Biocare Brånemark System® Mk III Groovy RP presentan un paso de rosca de 1,2 mm y una distancia interespira de 0,6 mm. La longitud del área roscada es de 8,9 mm variando su diámetro entre 3,1 mm y 3,7 mm mientras que el diámetro en el ápice del implante mide 2,9 mm.

Ambos implantes presentan un cuerpo cilíndrico con ápice plano y acanalado.

2.3 Desarrollo del biofilm

El desarrollo del biofilm sobre las superficies de los implantes dentales se llevó a cabo siguiendo el protocolo puesto a punto en el Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid y publicado por el grupo de investigación ETEP (Sanchez et al., 2011) explicado con anterioridad en la metodología de la fase I del estudio. En resumen, se realizaron cultivos puros de cada bacteria (a partir de los cultivos frescos conseguidos en las placas de agar sangre) en condiciones de anaerobiosis en medio BHI modificado durante 24-48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se midió la fase media exponencial por espectrofotometría y se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril hasta desarrollar una mezcla bacteriana que contuviera 10^3 UFC/ mL para *S. oralis*, 10^5 UFC/ml para *A. neaslundii* y *V. parvula*, y 10^6 UFC/mL para *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*.

En placas de cultivo tisular multipocillo (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) se colocaron las muestras de implantes estériles de cada una de las dos superficies en estudio inoculándose cada muestra con 1,5 mL de la mezcla bacteriana con concentraciones conocidas de cada bacteria en suspensión. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis para permitir el crecimiento bacteriano (10% H₂ y 10% CO₂ equilibrados con N₂) durante 96

horas. Para evitar contaminaciones no deseadas, en las mismas placas también se sometieron a incubación pocillos que contenían únicamente medio de cultivo.

2.4 Análisis de la biomasa y vitalidad del biofilm mediante CLSM

Antes de la evaluación por microscopía, se incubaron tres muestras de implantes de cada una de las dos microtopografías de superficie en estudio durante 96 horas en presencia de la mezcla bacteriana para el desarrollo del biofilm. Pasado el tiempo de incubación, los implantes con biofilm en su superficie se sometieron al mismo protocolo de aclarado y tinción con el kit de viabilidad bacteriana LIVE / DEAD® BacLight™ (Molecular Probes B. V., Leiden, Países Bajos) y en iguales condiciones de temperatura y tiempo que fueron empleados para el análisis por CLSM de los implantes en la fase I de las investigaciones. En esta ocasión, el microscopio confocal utilizado fue también el Olympus ® FV1200, configurado para tomar imágenes de 1,16 μm de grosor (12 bits, 1024 x 1024 píxeles).

Las colecciones de imágenes obtenidas fueron analizadas con los tres tipos diferentes de software que se emplearon durante la primera fase de la investigación:

- El software Imaris 7.7.0® (Bitplane, Zurich, Suiza) para la reconstrucción tridimensional a partir de los cortes obtenidos por el microscopio. Para el análisis de la superficie del implante se seleccionaron tres áreas diferentes y representativas: a) la espira del implante, b) el área entre espiras y c) el pico de la espira del implante, analizándose al menos tres muestras para cada tipo de superficie en estudio (rugosidad mínima y rugosidad moderada).
- El software Fiji (Image J, versión 2.0-rc-65/1.52b, software de procesamiento de imágenes de código abierto) para evaluar la proporción de bacterias vivas/muertas.
- El software COMSTAT (disponible como software gratuito en www.comstat.uk) para el cálculo de la biomasa en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$.

Los análisis se realizaron en el Centro Nacional de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Campus de Moncloa, Universidad Complutense de Madrid, España).

2.5 Análisis morfológico del biofilm mediante MEB

Pasado el tiempo de incubación de 96 horas, los implantes se sometieron a los procesos de aclarado, fijado, deshidratación, secado y pulverización en oro, siguiendo el mismo protocolo explicado previamente en el apartado de descripción de análisis mediante MEB de la fase I de la presente investigación.

Los implantes fueron analizados con el microscopio electrónico JSM 6400 (JSM6400, JEOL, Tokio, Japón), con un detector de electrones de dispersión posterior y una resolución de imagen de 25 kV. Se analizaron al menos tres implantes de cada rugosidad en estudio.

Los análisis se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica de las ICTS (Infraestructuras Científicas y Técnicas Singulares) (Campus de Excelencia Internacional de Moncloa, Universidad Complutense, Madrid, España).

2.6 Extracción de ADN y cuantificación de bacterias por qPCR

El aislamiento del ADN y su cuantificación por qPCR se realizó siguiendo exactamente el mismo protocolo empleado para el mismo proceso en la fase I de las investigaciones.

En esta ocasión, se analizaron tres muestras de implantes de cada tipo de microtopografía en estudio, repetido en tres experimentos independientes (n=9 para cada tipo de superficie).

2.7 Análisis estadístico

Se consideró como variable respuesta las concentraciones de cada bacteria incluida en el modelo de biofilm en cada superficie de implante. Para el estudio de la distribución de los datos se emplearon box-plots y la prueba de normalidad

Materiales y métodos

de Shapiro-Wilk. Se empleó tanto estadística descriptiva como la prueba t de Student. Como estadísticamente significativos se consideraron los valores $p < 0,05$.

El software empleado para el análisis de todos los datos fue IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, Estados Unidos).

Resultados



1 Fase I: Caracterización topográfica del crecimiento de un modelo *in vitro* de biofilm multiespecie sobre superficies de implantes dentales

1.1 Análisis por CLSM de la biomasa y viabilidad del biofilm

Mediante CLSM se estudió la distribución bacteriana en las diferentes áreas de la superficie del implante para cada uno de los tiempos de incubación en estudio. La presencia de bacterias adheridas a la superficie del implante desde las 12 a las 120 horas de incubación se muestran en las figuras 11 a 13.

En las primeras 12 horas, pudo observarse la colonización de las primeras bacterias extendidas por toda la superficie del implante, la mayoría de ellas vivas (proporción células vivas/muertas, 5,14) (Figura 11A). Aunque las primeras bacterias aparecieron de manera individual, también pudo verse como ya algunas se agrupaban en agregados multicelulares. La cuantificación de la biomasa confirmó este predominio de bacterias vivas ($0,052 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) frente a las bacterias muertas ($0,015 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). En esta etapa del desarrollo del biofilm, la superficie del implante correspondiente a la zona entre espiras apareció prácticamente libre de bacterias (color azul, figura 11A), mientras que las zonas laterales de la espira y el pico de ésta aparecieron completamente cubiertas por bacterias vivas (color verde, Figura 11A).

Tras 24 horas de incubación, las células que se encontraban dispuestas de manera individual comenzaron a unirse formando microcolonias extendidas por toda la superficie del implante, en las zonas laterales y pico de la espira, y en el área entre espiras (Figura 11B). En este punto, las bacterias vivas seguían siendo predominantes sobre las bacterias muertas con una proporción de células

Resultados

vivas/muertas de 4,37 y una cuantificación de la biomasa de $0,058 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para las bacterias vivas frente a $0,026 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para las bacterias muertas.

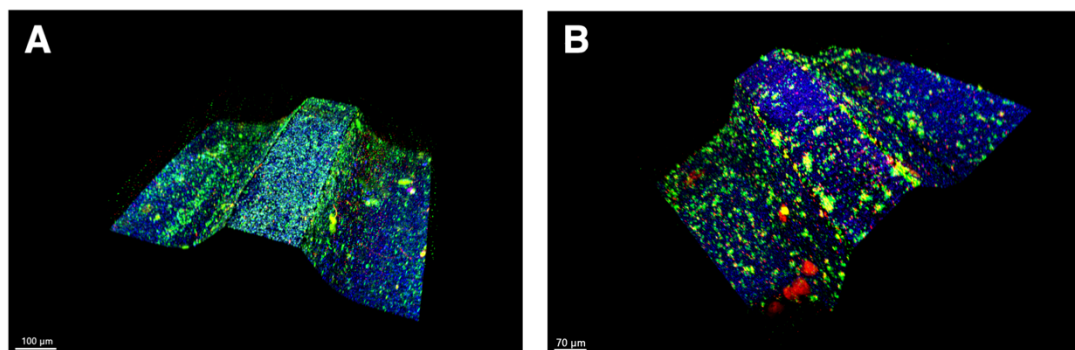


Figura 11. Imágenes obtenidas por Microscopía Confocal Láser de Barrido (20x) a 12 (A; escala=100 μm) y 24 (B; escala=70 μm) horas de incubación de un biofilm desarrollado sobre superficies de implantes gracias al uso del kit de viabilidad celular LIVE/DEAD® BacLight. En estas imágenes fue posible diferenciar la distribución de bacterias vivas (color verde) y bacterias muertas (color rojo) sobre la superficie del implante de titanio (color azul) en los dos tiempos de incubación del biofilm.

A medida que el tiempo de incubación avanzó a las 48 horas (Figura 12A), la estructura del biofilm adquirió una morfología más compleja y las células bacterianas muertas (color rojo en la Figura 12A) comenzaron a evidenciarse sobre la superficie del implante, pasando a ser la proporción de bacterias vivas/muertas de 2,58. La cuantificación de la biomasa mostró un número ligeramente mayor de bacterias muertas ($0,086 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$) que de bacterias vivas ($0,076 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$). Cabe remarcar que las bacterias muertas se localizaron principalmente en el área entre las espiras y en las superficies laterales del esta, mientras que las bacterias vivas se limitaron al área más externa de la espira, en el pico.

Tras 72 horas de incubación (Figura 12B), hubo una disminución de la biomasa bacteriana confirmada por COMSTAT, con $0,017 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ para bacterias vivas y $0,026 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ para bacterias muertas. Sin embargo, estas cifras aumentaron de nuevo al llegar a las 96 horas de incubación, siendo nuevamente las células vivas las que predominaron sobre las muertas (proporción células vivas/muertas, 2,91) (cuantificación de la biomasa, $0,044 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ para bacterias vivas y $0,032 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ para bacterias muertas. En este

momento de incubación (96 horas) la distribución bacteriana observada fue la misma que pudo apreciarse a las 48 horas, con microcolonias presentes en toda la superficie del implante, la mayoría de las bacterias muertas localizadas en el área entre espiras y en las zonas laterales de esta, y las bacterias vivas predominando en la parte más externa, en el pico de la espira (Figura 13A).

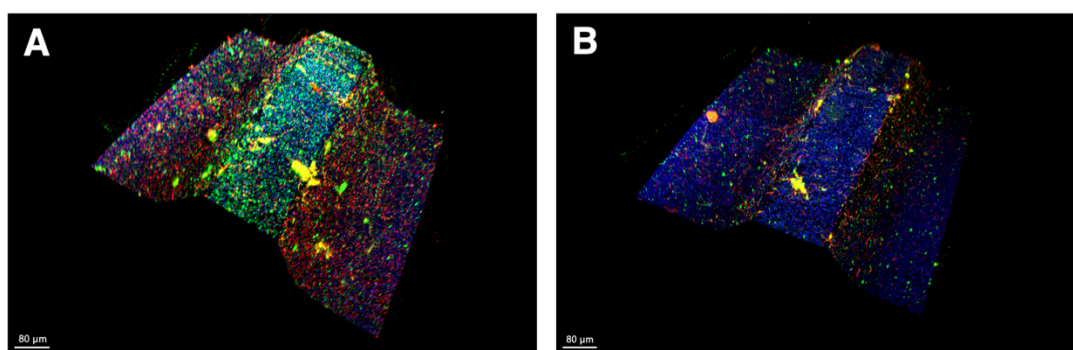


Figura 12. Imágenes obtenidas por Microscopía Confocal Láser de Barrido (20x) a 48 (A; escala=80 μm) y 72 (B; escala=80 μm) horas de incubación de un biofilm desarrollado sobre superficies de implantes gracias al uso del kit de viabilidad celular LIVE/DEAD® BacLight. En estas imágenes fue posible diferenciar la distribución de bacterias vivas (color verde) y bacterias muertas (color rojo) sobre la superficie del implante de titanio (color azul) en los dos tiempos de incubación del biofilm.

A las 120 horas de incubación, pudo apreciarse una clara disminución en el volumen del biofilm, encontrando un predominio de bacterias muertas (cuantificación de la biomasa de $0,020 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$) sobre las vivas ($0,005 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$), dando como resultado una proporción de células vivas/muertas de 0,71 (Figura 13B).

Resultados

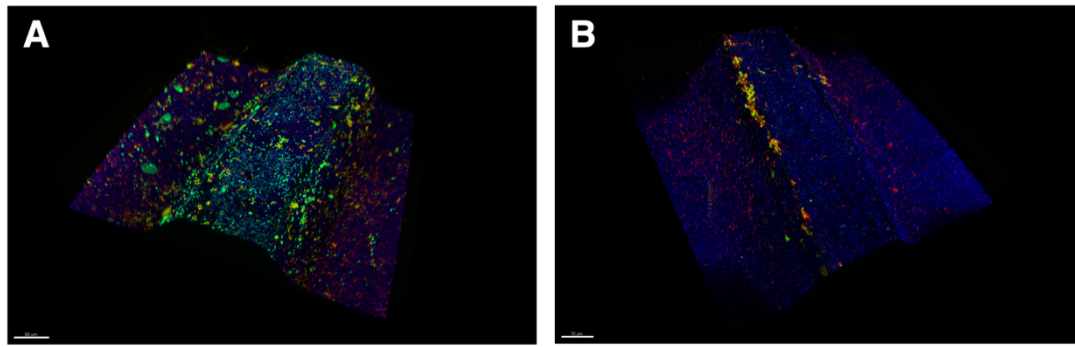


Figura 13. Imágenes obtenidas por Microscopía Confocal Láser de Barrido (20x) a 96 (A; 80 μm) y 120 (B; escala=70 μm) horas de incubación de un biofilm desarrollado sobre superficies de implantes gracias al uso del kit de viabilidad celular LIVE/DEAD® BacLight. En estas imágenes fue posible diferenciar la distribución de bacterias vivas (color verde) y bacterias muertas (color rojo) sobre la superficie del implante de titanio (color azul) en los dos tiempos de incubación del biofilm.

1.2 Análisis morfológico del biofilm por MEB

Gracias al uso de la microscopía electrónica de barrido pudieron obtenerse imágenes a una alta resolución para la observación del biofilm formado sobre la superficie del implante de titanio a lo largo de los diferentes tiempos de incubación en estudio. Estas imágenes mostraron las correspondientes bacterias rodeadas de la característica matriz extracelular (Figuras 14-16).

En las imágenes obtenidas tras las primeras 12 horas de incubación, pudieron reconocerse claramente células en forma de huso (flechas rojas, Figura 14) y cortas cadenas de estreptococos (flechas azules, Figura 14), que sugieren a

F. nucleatum y *S. oralis*, respectivamente, rodeadas de una ligera capa de matriz extracelular (flechas verdes, Figura 14).

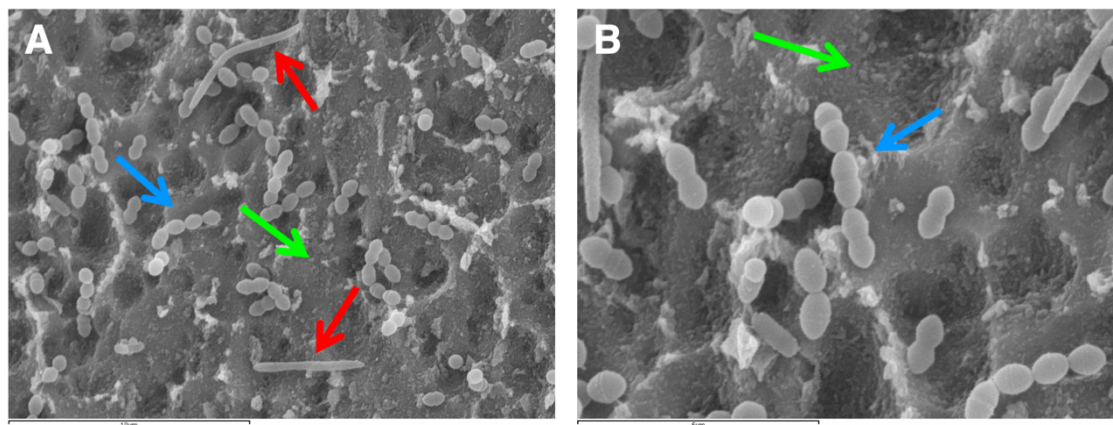


Figura 14. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de biofilms de 12 horas de incubación [A (120x) (escala=10 µm); B (2500x) (escala=5 µm)] en las que pudieron observarse células que sugieren a *F. nucleatum* (flechas rojas) y *S. oralis* (flechas azules) rodeados de una ligera matriz extracelular (flechas verdes).

A medida que el tiempo de incubación avanzó de 24 a 120 horas, las células que se encontraban ubicadas de manera individual comenzaron a agruparse en microcolonias ocurriendo al mismo tiempo que el aumento de la presencia de la masa celular (Figuras 15 y 16).

Tal y como se muestra en la figura 15 con diferentes aumentos y a diferentes tiempos de incubación (Figura 15A-15B, 24 horas; Figura 15C, 48 horas), las células del biofilm formado sobre la superficie del implante mostraron la capacidad de crear relaciones interespecie de manera que en las imágenes obtenidas podían apreciarse a las células en forma de huso (*F. nucleatum*)

Resultados

formando redes complejas y estructuras tridimensionales con microcolonias de otras bacterias de diferente morfología adheridas a ellas (Figura 15).

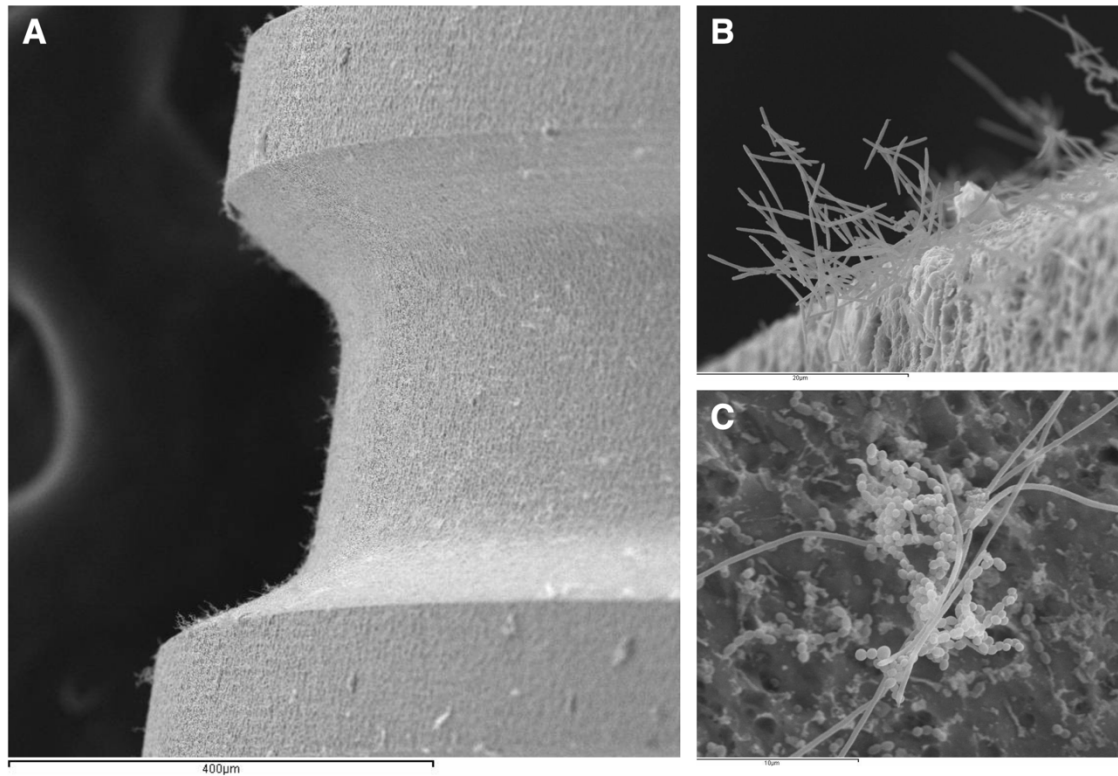


Figura 15. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de biofilms de 24 [A (5000x) (escala=400 μm); B(10000x) (escala=20 μm).] y 48 [C (1000x) (escala=10 μm)] horas de incubación que mostraron las relaciones interespecie entre las diferentes células que formaron el biofilm.

Cuando el biofilm alcanzó cierto estado de madurez (desde las 72 a las 120 horas de incubación) (Figura 16), la masa celular bacteriana, recubierta de una densa matriz extracelular (Figura 16, flechas verdes), cubrió la superficie del implante mostrando la morfología típica de microcolonias celulares formando

parte de grandes comunidades bacterianas y la presencia de amplios canales entre ellas (Figura 16, flechas rojas).

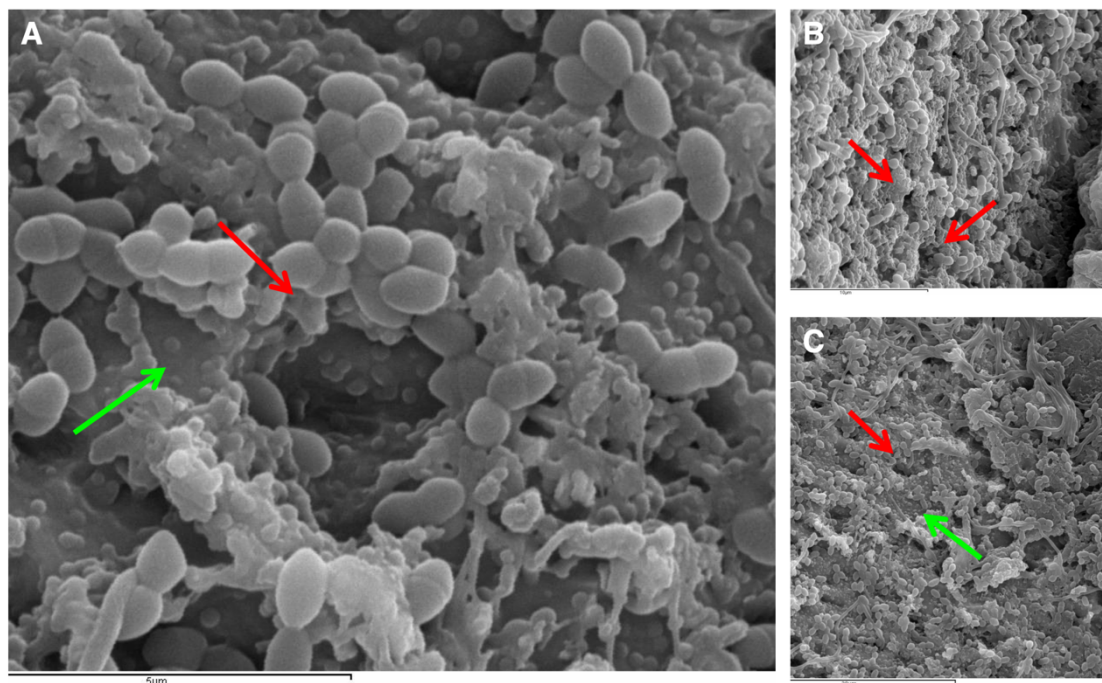


Figura 16. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de biofilms de 72 [A (4000x) (escala=5 μm)], 96 [B (5000x) (escala=20 μm)] y 120 [C (10000x) (escala=10 μm)] horas de incubación. Las flechas rojas muestran la presencia de amplios canales entre las masas bacterianas en crecimiento rodeadas, a su vez, por una densa matriz extracelular (flechas verdes).

Llegado el máximo tiempo de incubación (120 horas), las imágenes no muestran diferencias en la arquitectura del biofilm (Figura 16C).

1.3 Evaluación Cuantitativa de Bacterias por qPCR

El análisis cuantitativo de los biofilms formados sobre la superficie del implante a lo largo de los diferentes tiempos de incubación en estudio mostraron la presencia bacteriana desde las primeras horas de incubación de manera que, ya a las 12 horas, las seis especies bacterianas incluidas en el estudio se detectaron en la superficie del implante. La figura 17 y la tabla 2 representan los recuentos, expresados en UFC / mL, de cada especie bacteriana de acuerdo con los diferentes tiempos de incubación. La Figura 18 muestra la dinámica de incorporación de las diferentes células bacterianas a la superficie del implante, y las diferencias

Resultados

significativas en las cifras para cada especie bacteriana en relación con los diferentes tiempos de incubación.

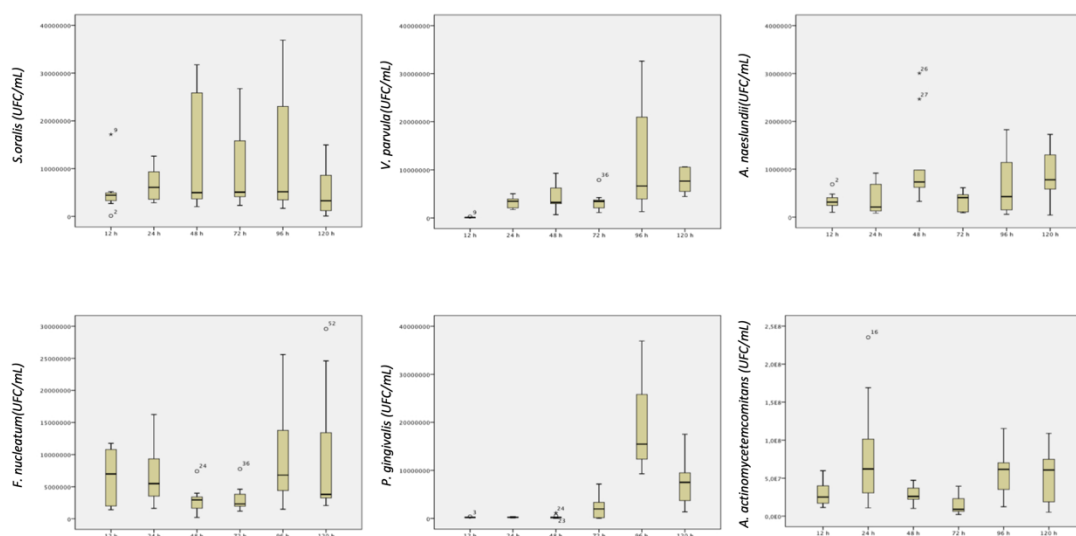


Figura 17. Box-plot de cada especie bacteriana determinada por qPCR en biofilms de 12 a 120 horas de incubación (n=9), crecidos sobre implantes dentales, utilizando cebadores y sondas específicos dirigidos al gen 16S rRNA.

Los resultados obtenidos en base a las diferentes especies bacterianas empleadas en la investigación evidenciaron la presencia de *S. oralis* (colonizador primario) en la superficie del implante desde las 12 horas, aumentando gradualmente en densidad hasta 120 horas y alcanzando las cifras más altas a las 96 horas de incubación [$1,4 \times 10^7$ UFC/mL (DE= $1,4 \times 10^7$ UFC/mL)]. Por otro lado, *A. naeslundii*, aumentó significativamente desde el comienzo hasta las 48 horas [$1,1 \times 10^6$ UFC/mL (DE= $9,3 \times 10^5$ UFC/mL)], momento a partir del cual comenzó a disminuir ligeramente alcanzando a las 72 horas $3,1 \times 10^5$ UFC/mL (DE= $2,0 \times 10^5$ UFC/mL). Las cifras se mantuvieron después hasta las 120 horas [$9,0 \times 10^5$ UFC/mL (DE= $5,4 \times 10^5$ UFC/mL)]. Otro colonizador temprano, *V. parvula*, también mostró un aumento significativo en sus cifras hasta las 96 horas de incubación [$1,2 \times 10^7$ UFC/mL (DE= $1,1 \times 10^7$ UFC/mL)], manteniéndose estable hasta las 120 horas [$7,8 \times 10^6$ UFC/mL (DE= $2,6 \times 10^6$ UFC/mL)], (Tabla 2, Figura 18).

El colonizador secundario, *F. nucleatum*, presente ya en la superficie del implante con altas cifras desde las 12 horas de incubación [$6,8 \times 10^6$ UFC/mL (DE= $4,2 \times 10^6$ UFC/mL)], alcanzó su máxima densidad a las 96 horas [$1,0 \times 10^7$ UFC/mL (DE= $8,4 \times 10^6$ UFC/mL)]. A partir de este punto, y durante el resto del proceso de incubación, se mantuvo estable [120 horas, $9,7 \times 10^6$ UFC/mL (DE= $1,0 \times 10^7$ UFC/mL)] (Tabla 2, Figura 18).

Resultados

Especies bacterianas	Tiempo de incubación (horas)	Concentración bacteriana (UFC/mL)		
		Media (Desviación estándar)	Intervalo de confianza 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<i>S. oralis</i>	12	5,2x10 ⁶ (4,7x10 ⁶)	1,5x10 ⁶	8,8x10 ⁶
	24	6,5x10 ⁶ (3,4x10 ⁶)	3,8x10 ⁶	9,1x10 ⁶
	48	1,3x10 ⁷ (1,2x10 ⁷)	3,8x10 ⁶	2,3x10 ⁷
	72	1,0x10 ⁷ (8,4x10 ⁶)	3,7x10 ⁶	1,7x10 ⁷
	96	1,4x10 ⁷ (1,4x10 ⁷)	3,9x10 ⁶	2,5x10 ⁷
	120	5,4x10 ⁶ (5,3x10 ⁶)	1,3x10 ⁶	9,5x10 ⁶
<i>V. parvula</i>	12	9,4x10 ⁴ (8,0x10 ⁴)	3,3x10 ⁴	1,5x10 ⁵
	24	3,3x10 ⁶ (1,1x10 ⁶)	2,4x10 ⁶	4,1x10 ⁶
	48	4,4x10 ⁶ (2,6x10 ⁶)	2,5x10 ⁶	6,4x10 ⁶
	72	3,9x10 ⁶ (2,1x10 ⁶)	1,7x10 ⁶	4,9x10 ⁶
	96	1,2x10 ⁷ (1,1x10 ⁷)	3,8x10 ⁶	2,1x10 ⁷
	120	7,8x10 ⁶ (2,6x10 ⁶)	5,8x10 ⁶	9,8x10 ⁶
<i>A. naeslundii</i>	12	3,2x10 ⁵ (1,8x10 ⁵)	1,8x10 ⁵	4,7x10 ⁵
	24	3,6x10 ⁵ (3,3x10 ⁵)	1,1x10 ⁵	6,1x10 ⁵
	48	1,1x10 ⁶ (9,3x10 ⁵)	4,3x10 ⁵	1,9x10 ⁶
	72	3,1x10 ⁵ (2,0x10 ⁵)	1,5x10 ⁵	4,7x10 ⁵
	96	7,0x10 ⁵ (6,5x10 ⁵)	2,0x10 ⁵	1,2x10 ⁶
	120	9,0x10 ⁵ (5,4x10 ⁵)	4,9x10 ⁵	1,3x10 ⁶
<i>F. nucleatum</i>	12	6,8x10 ⁶ (4,2x10 ⁶)	3,5x10 ⁶	1,0x10 ⁷
	24	7,0x10 ⁶ (5,0x10 ⁶)	3,1x10 ⁶	1,1x10 ⁷
	48	3,0x10 ⁶ (2,0x10 ⁶)	1,4x10 ⁶	4,5x10 ⁶
	72	3,2x10 ⁶ (2,1x10 ⁶)	1,6x10 ⁶	4,8x10 ⁶
	96	1,0x10 ⁷ (8,4x10 ⁶)	3,8x10 ⁶	1,7x10 ⁷
	120	9,7x10 ⁶ (1,0x10 ⁷)	1,6x10 ⁶	1,8x10 ⁷
<i>P. gingivalis</i>	12	2,2x10 ⁵ (8,4x10 ⁴)	1,5x10 ⁵	2,8x10 ⁵
	24	2,4x10 ⁵ (8,9x10 ⁴)	1,7x10 ⁵	3,1x10 ⁵
	48	3,0x10 ⁵ (3,5x10 ⁵)	2,6x10 ⁴	5,7x10 ⁵
	72	2,3x10 ⁶ (2,3x10 ⁶)	5,3x10 ⁵	4,1x10 ⁶
	96	2,0x10 ⁷ (1,1x10 ⁷)	1,1x10 ⁷	2,8x10 ⁷
	120	7,6x10 ⁶ (5,5x10 ⁶)	3,4x10 ⁶	1,2x10 ⁷
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	12	2,9x10 ⁷ (1,6x10 ⁷)	1,6x10 ⁷	4,2x10 ⁷
	24	8,1x10 ⁷ (7,6x10 ⁷)	2,8x10 ⁷	1,4x10 ⁸
	48	2,8x10 ⁷ (1,2x10 ⁷)	1,9x10 ⁷	3,8x10 ⁷
	72	1,5x10 ⁷ (1,3x10 ⁷)	5,1x10 ⁶	2,5x10 ⁷
	96	6,1x10 ⁷ (3,2x10 ⁷)	3,6x10 ⁷	8,6x10 ⁷
	120	5,5x10 ⁷ (3,6x10 ⁷)	2,7x10 ⁷	8,3x10 ⁷

Tabla 2. Concentraciones bacterianas [Unidades formadoras de colonias (UFC) / mL] determinadas por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en biofilms de 12 a 120 h en implantes dentales de titanio (n = 9), utilizando cebadores y sondas específicos dirigidos al gen 16S rRNA.

Los colonizadores tardíos también se detectaron en el biofilm desde las 12 horas de incubación. Los resultados mostraron que *P. gingivalis* sufrió un aumento en su concentración desde las 12 a las 96 horas, momento en el cual alcanzó su cifra máxima [$2,0 \times 10^7$ UFC/mL (DE= $1,1 \times 10^7$ UFC/mL)] (Tabla 2) (Figura 18); *A. actinomycetemcomitans*, presente en el biofilm desde las 12 horas con cifras relativamente altas, mostró dos picos en su concentración obteniendo los valores más altos a las 24 y 96 horas de incubación [$8,1 \times 10^7$ UFC/mL (DE= $7,6 \times 10^7$ UFC/mL) y $6,1 \times 10^7$ UFC/mL (DE= $3,2 \times 10^7$ UFC/mL), respectivamente] (Tabla 2) (Figura 18).

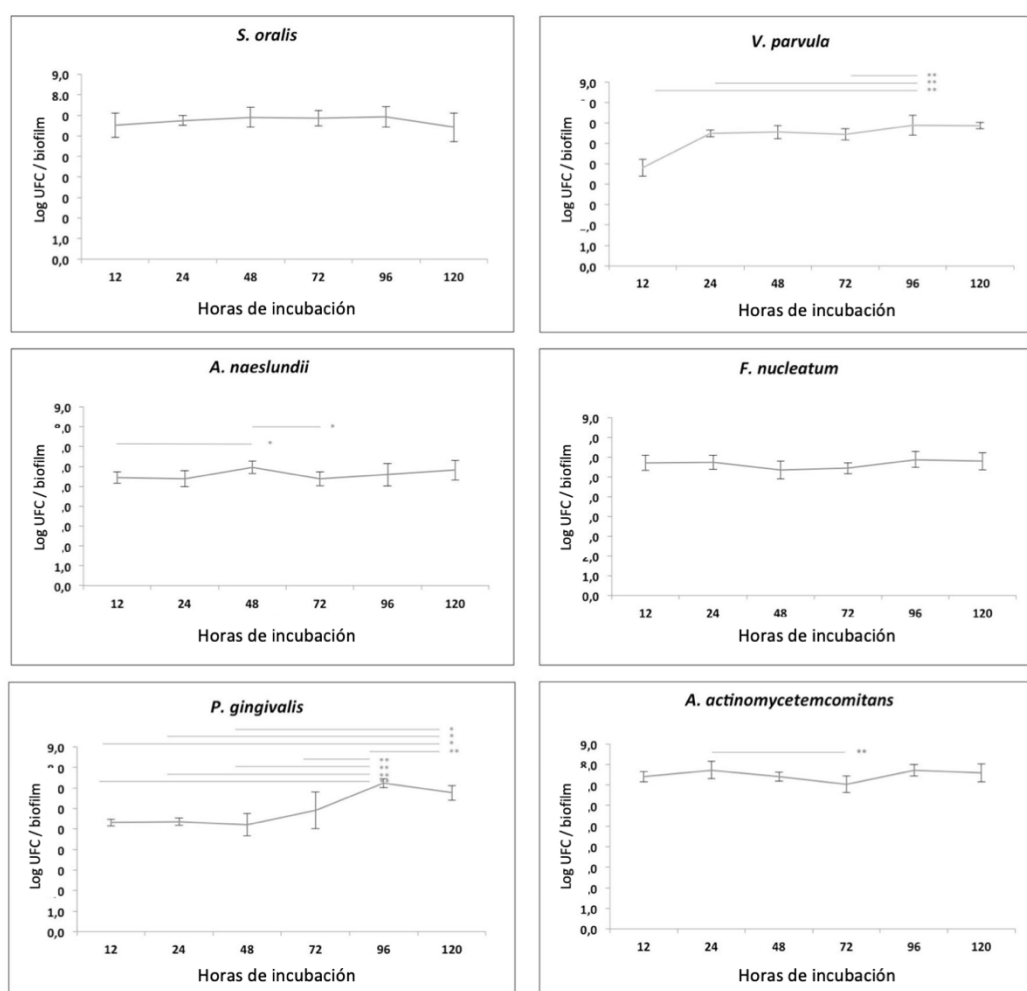


Figura 18. Cinética de incorporación de las seis especies bacterianas [log de unidades formadoras de colonias (UFC) / mL] en el biofilm sobre implantes dentales, obtenida por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) de biofilms de 12 a 120 horas de incubación, utilizando cebadores y sondas dirigidas al gen 16S rRNA, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Resultados

1.4 Reproducibilidad

La tabla 3 muestra los resultados del estudio de reproducibilidad que compara estos resultados con los obtenidos al desarrollar sobre discos el mismo modelo de biofilm multiespecie validado con anterioridad (Sanchez et al., 2014). Aunque los coeficientes de variación fueron altos, los porcentajes fueron similares en los resultados de ambas investigaciones. Los porcentajes más altos se detectaron en las especies *V. parvula* y *A. naeslundii* y los menores en *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

Bacteria	Material del dispositivo empleado			
	D HA	D Ti	D Zn	Imp
<i>S. oralis</i>	82,1	36,5	44,9	71,1
<i>V. parvula</i>	145,9	92,9	83,9	156,3
<i>A. naeslundii</i>	158,3	66,8	81,6	152,4
<i>F. nucleatum</i>	151,2	75,7	86,3	90,9
<i>P. gingivalis</i>	36,3	43,6	57,7	65,5
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1,9	99,1	37,3	63,1

Tabla 3. Coeficiente de variación (CV, %) de los valores obtenidos en implantes dentales en su forma comercial (Imp) (n=18) y discos de hidroxiapatita o (D HA) (n=3), discos de titanio (D Ti) (n=3), discos de zirconio (D Zn) (n=3) (Sanchez et al., 2014) para cada bacteria empleada en el modelo.

1.5 Formación de biofilms sobre implantes soportados

Las figuras 19 y 20 representan imágenes obtenidas por MEB del biofilm desarrollado sobre implantes de titanio anclados en soportes de metacrilato tanto de la mitad coronal no insertada libre de soporte (Figura 19), como de la mitad apical insertada en el soporte (Figura 20). Tras las 96 horas de incubación del biofilm, los implantes anclados sobre los soportes de metacrilato presentaron

masa bacteriana sobre la superficie de la zona no incluida en el soporte (Figura 19A). En la parte más externa de la espira (Figura 19B), la masa observada era extremadamente densa con diferentes morfologías bacterianas como cocos (representativas de *S. oralis*) y células en forma de huso (representativas de *F. nucleatum*). En el área localizada entre espiras, pudieron apreciarse a las células bacterianas en forma de huso (íntimamente asociadas a *F. nucleatum*) asociadas en comunidades y rodeadas por una densa matriz extracelular (Figura 19C). En comparación con la parte más externa de la espira, las microcolonias del área localizada entre espiras se observaron más dispersas sobre la superficie, es decir, con más separación entre ellas.

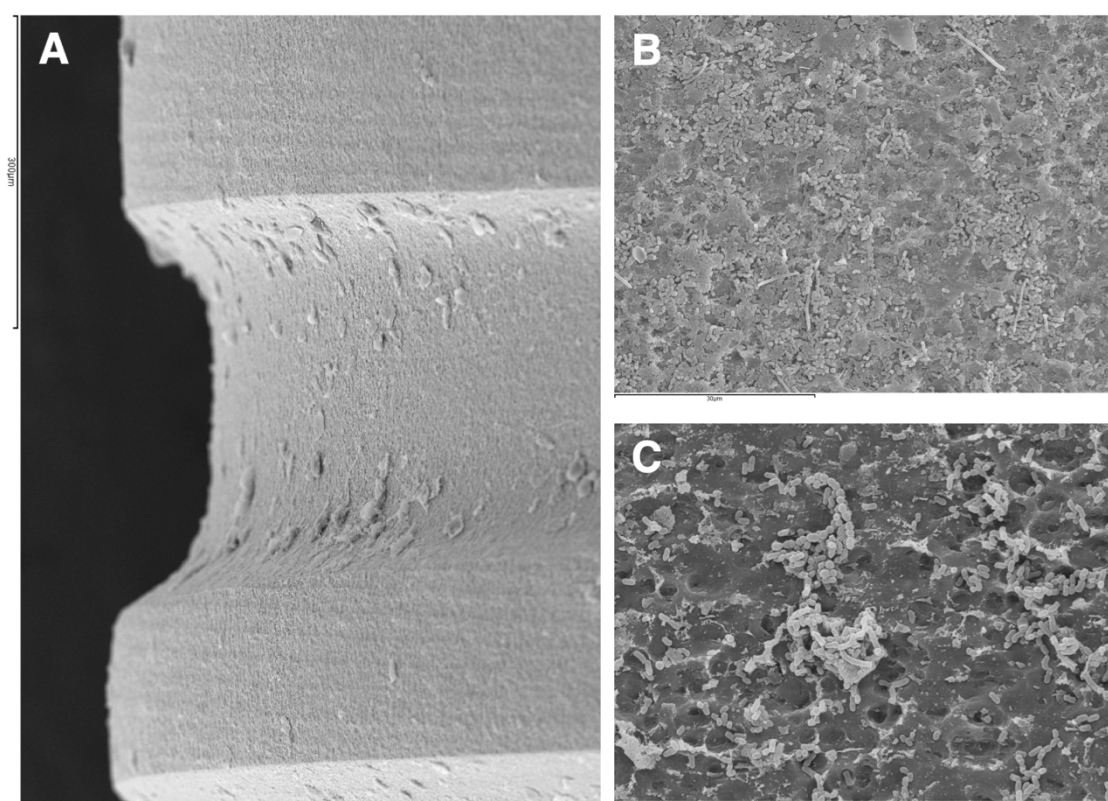


Figura 19. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de biofilms de 96 horas de incubación sobre implantes anclados en soportes de metacrilato de la zona del implante que quedó expuesta. La imagen A [(150x) (escala=300 µm)] mostró la densa masa celular bacteriana rodeada de la matriz extracelular sobre la superficie expuesta del implante durante el periodo de incubación. En la imagen B [(1500x) (escala=30 µm)], se analizó la parte más externa de la espira del implante mientras que la imagen C (3000x) (escala=10 µm) corresponde al área localizada entre espiras.

Aunque las células bacterianas fueron capaces de colonizar el área del implante anclada en el dispositivo (Figura 20), el biofilm desarrollado era menos

Resultados

denso, mostrando colonias bacterianas muy dispersas, en su mayoría formadas por células representativas de *F. nucleatum* y rodeadas por una delgada matriz extracelular (Figura 20B, C).

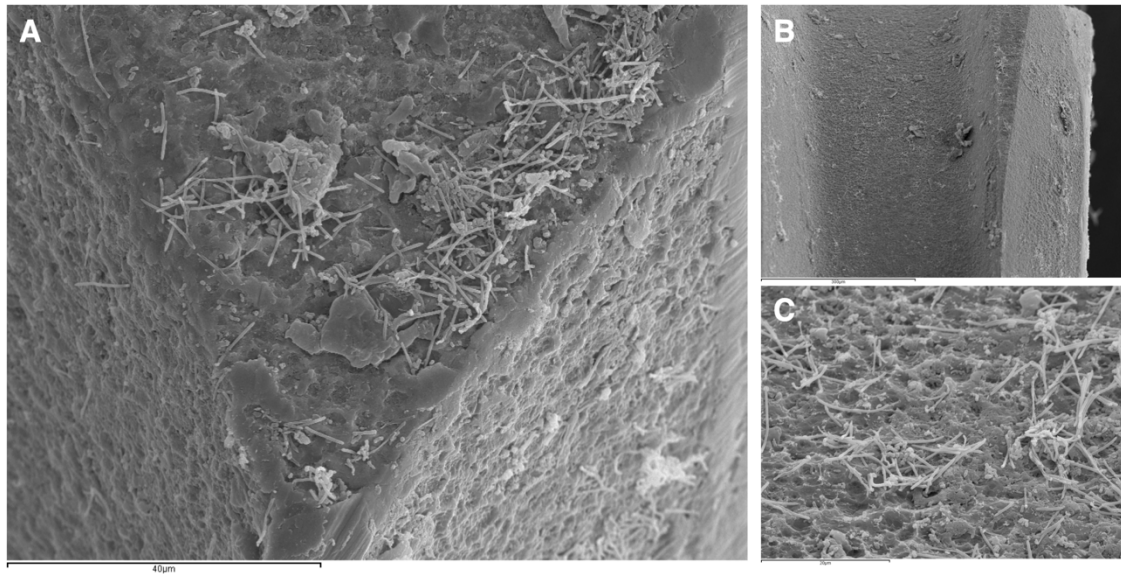


Figura 20. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de biofilms de 96 horas de incubación sobre implantes anclados en soportes de metacrilato de la zona del implante introducida en el metacrilato. La imagen B [(160x) (escala=300 µm)], confirmó la presencia bacteriana en la superficie del implante que se mantuvo introducida en el soporte durante las 96 horas de incubación. Sin embargo, las imágenes A (1200x) (escala=40 µm), y C [(2000x) (escala=20 µm)] mostraron como, a pesar de darse colonización bacteriana, el biofilm formado es menos denso y con microcolonias más dispersas sobre la superficie.

2 Fase II: Estudio *in vitro* de las diferencias en la formación del biofilm sobre implantes dentales con diferentes microtopografías de superficie

2.1 Análisis por CLSM de la biomasa y viabilidad del biofilm

En las figuras 21 y 22 se pueden ver representados sobre las dos microtopografías de superficie de implantes dentales en estudio (rugosidad mínima y rugosidad moderada, respectivamente) biofilms de 96 horas de incubación, observándose una distribución heterogénea de las colonias a lo largo de la superficie del implante.

En los implantes de superficie de rugosidad mínima, las imágenes obtenidas por CLSM mostraron las células bacterianas agrupadas en microcolonias, con un alto predominio de bacterias vivas frente a muertas [proporción bacterias vivas / muertas de 5,41 (DE=2,95)] (Figura 21, con bacterias vivas en color verde y muertas en color rojo). A pesar de que se encontraron células bacterianas repartidas por toda la superficie del implante, se pudo evidenciar una preferencia de las microcolonias por colonizar el pico de la espira y las superficies laterales de las espiras, apareciendo las zonas entre espiras prácticamente libres de bacterias (Figura 21; en azul, la superficie del implante).

Resultados

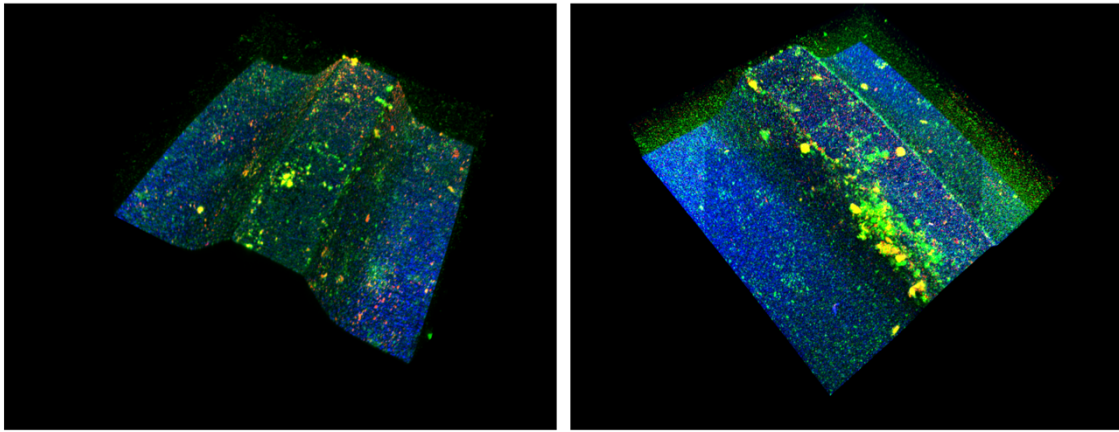


Figura 21. Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal de barrido (20x) de biofilms incubados durante 96 horas sobre superficies de implantes de rugosidad mínima ($Sa \approx 0.5-1\mu$) teñidos gracias al uso del kit de viabilidad celular LIVE/DEAD® BacLight. Se diferencian las bacterias vivas (verde), bacterias muertas (rojo) y la superficie del implante (en azul por su propia fluorescencia). Las imágenes mostraron bacterias agrupadas en microcolonias con un predominio de las bacterias vivas sobre las muertas y localizadas en su mayoría en el pico y en las paredes laterales de la espira, quedando la zona localizada entre espiras prácticamente libre de bacterias.

En los implantes de superficie de rugosidad moderada, los biofilms también mostraron un predominio de bacterias vivas en relación a las muertas [proporción de células vivas / muertas de 7,44 (DE = 2,97)] con una distribución similar de las microcolonias bacterianas, con bacterias diseminadas en toda la superficie del implante pero concentrándose principalmente en las superficies de los picos y laterales de las espiras del implante, mientras la acumulación fue menos evidente en las áreas entre espiras (Figura 22).

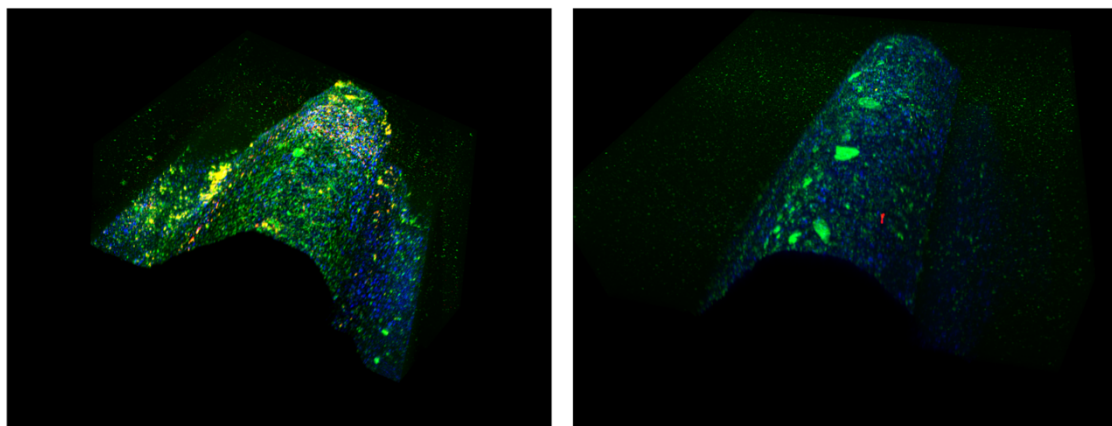


Figura 22. Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal de barrido (20x) de biofilms incubados durante 96 horas sobre superficies de implantes de rugosidad moderada ($Sa \approx 1-2 \mu$) teñidos gracias al uso del kit de viabilidad celular LIVE/DEAD® BacLight. Se diferencian las bacterias vivas (verde), bacterias muertas (rojo) y la superficie del implante (en azul por su propia fluorescencia). Las imágenes mostraron bacterias agrupadas en microcolonias predominando las bacterias vivas sobre las muertas, localizadas en su mayoría en el pico y en las paredes laterales de la espira, quedando la zona entre espiras prácticamente libre de bacterias.

La cuantificación de la biomasa mostró un mayor recuento en la superficie de rugosidad moderada [$0,015 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ (DE = $0,002 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$)] que en la superficie de rugosidad mínima [$0,028 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ (DE = $0,022 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$)].

2.2 Análisis morfológico del biofilm por MEB

Durante el análisis de las imágenes de alta resolución obtenidas por microscopía electrónica de barrido tras el periodo de incubación de 96 horas, pudo reconocerse la presencia de un biofilm maduro en las dos microtopografías de superficie en estudio (Figuras 23 y 24).

En los implantes de superficie de rugosidad mínima(Figura 23) las células se identificaron organizadas en grandes cúmulos bacterianos con presencia de anchos canales anchos entre ellos (Figura 23B, flechas rojas). En las imágenes, pudieron reconocerse células en forma de huso, que sugerían a *F. nucleatum*, formando estructuras tridimensionales con cortas cadenas de estreptococos adheridas (reconocidas como *S. oralis*) (Figura 23, flechas azules). Pudo observarse también cómo la superficie del implante se encontraba totalmente recubierta por una densa matriz extracelular (Figura 23, flechas verdes).

Resultados

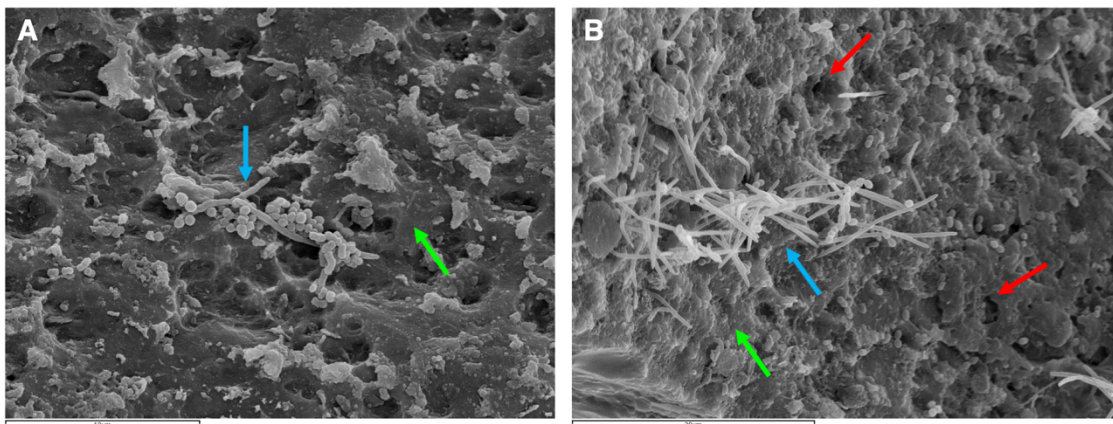


Figura 23. Imágenes obtenidas por microscopía láser de barrido de biofilms de 96 horas de incubación sobre superficies de implantes de rugosidad mínima ($S_a \approx 0.5-1\mu$) [A (4000x) (escala=10 μ m); B (500x) (escala=20 μ m)].

Sobre los implantes de superficie de rugosidad moderada, las imágenes mostraron biofilms de similares características estructurales (Figura 24), observándose una densa matriz extracelular (Figura 24, flechas verdes), cubriendo la superficie completa del implante, con bacterias organizadas en cúmulos de células entre amplios canales (Figura 24B, flecha roja). De igual manera, aparecieron células en forma de huso con cortas cadenas de estreptococos adheridas, todas ellas agrupadas en colonias formando redes complejas (Figura 24A, flecha azul).

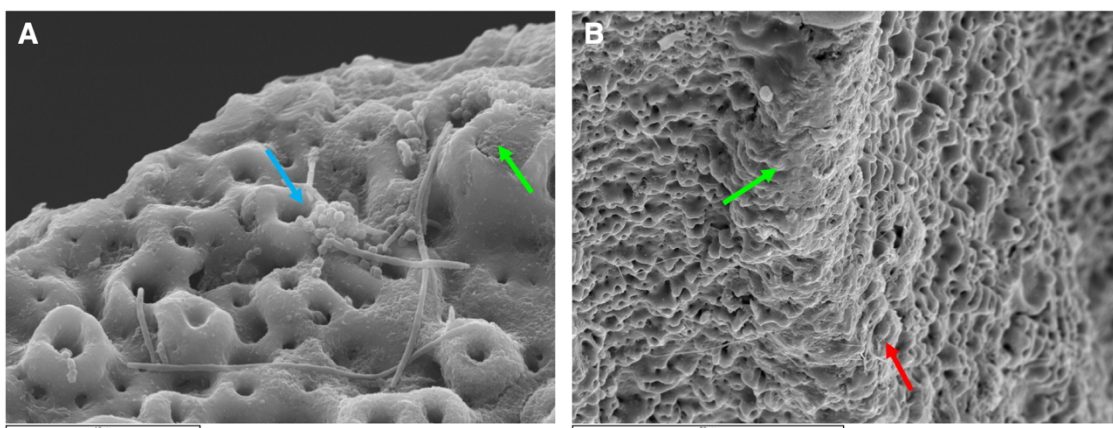


Figura 24. Imágenes obtenidas por microscopía láser de barrido de biofilms de 96 horas de incubación sobre superficies de implantes de rugosidad moderada ($S_a \approx 1-2\mu$) [A (800x) (escala 10= μ m); B (800x) (escala=70 μ m)].

Cabe señalar la peculiaridad de encontrar células bacterianas dentro de los grandes poros característicos que confieren de mayor rugosidad a la superficie de rugosidad moderada, a diferencia de la superficie mínimamente rugosa, donde no existen tales poros y las bacterias se depositaron de manera más uniforme (Figura 25, flechas amarillas).

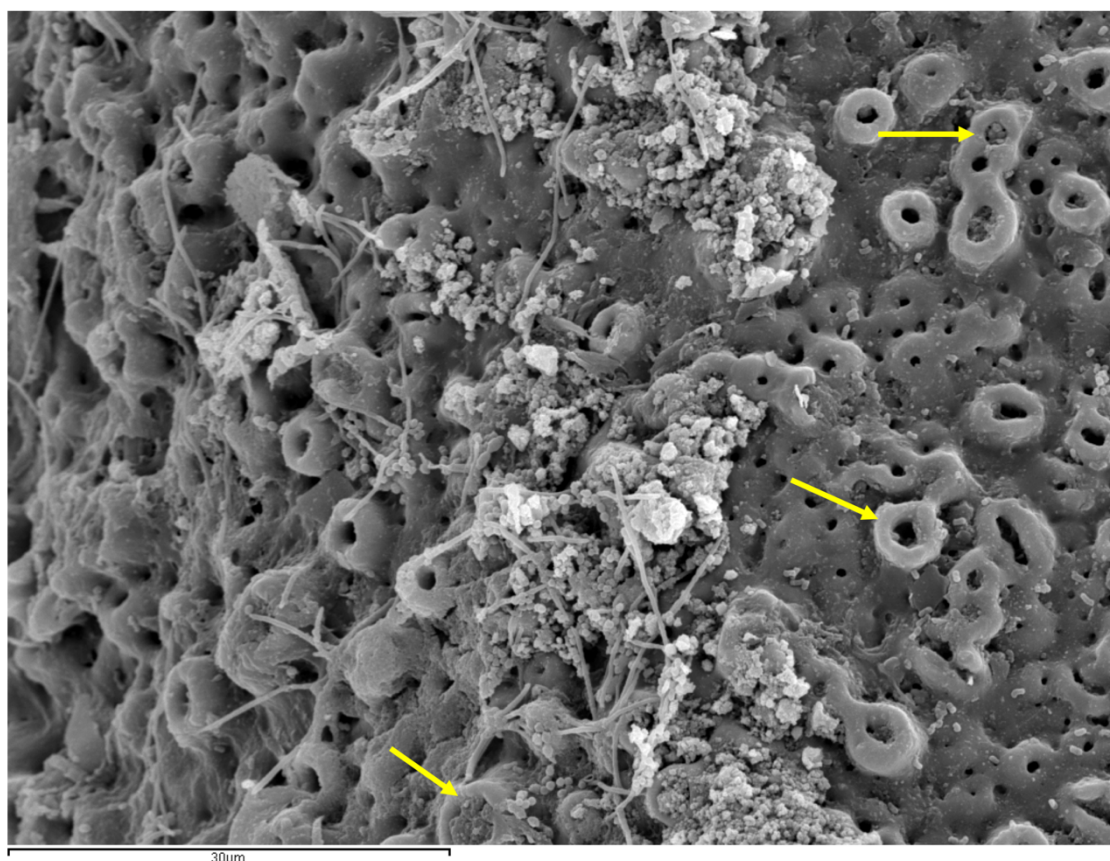


Figura 25. Imagen obtenida por microscopía láser de barrido de biofilm de 96 horas de incubación sobre superficie de implante de rugosidad moderada ($Sa \approx 1-2 \mu$) (1500x) (escala=30 μ m). Pueden observarse células bacterianas introducidas en los poros que dotan de rugosidad a esta superficie (flechas amarillas).

2.3 Evaluación Cuantitativa de Bacterias por qPCR

Tras las 96 horas de incubación estipuladas (96 horas), pudieron detectarse las seis especies bacterianas utilizadas en el modelo de biofilm sobre las dos superficies en estudio: superficies de rugosidad mínima y superficie de rugosidad moderada. La tabla 4 muestra la cuantificación de cada especie

Resultados

bacteriana sobre los dos tipos de superficie con medias, DE, diferencias de medias, límites de confianza y significación estadística; la figura 26 muestra la distribución de los datos de las cantidades relativas de las diferentes bacterias en cada tipo de implante.

Los biofilms formados sobre la microtopografía de rugosidad moderada y mínima no mostraron diferencias significativas en el número (UFC / mL) de los colonizadores iniciales *S. oralis* y *A. naeslundii*, así como tampoco para el colonizador precoz *V. parvula* ($p > 0,05$) (Tabla 4; Figura 26).

Fusobacterium nucleatum fue detectado en los biofilms formados sobre ambas superficies de implantes en estudio, mostrando una concentración significativamente menor en los implantes de superficie de rugosidad mínima en comparación con los implantes de superficie de rugosidad moderada [$4,88 \times 10^6$ UFC/mL (DE= $3,64 \times 10^6$ UFC/mL) frente a $9,31 \times 10^6$ UFC/mL (DE= $3,08 \times 10^6$ UFC/mL); $p=0,013$].

Por otro lado, mientras que el colonizador tardío *P. gingivalis* se detectó en los biofilms de ambas superficies con concentraciones similares ($p=0,564$) (Tabla 4; Figura 26), *A. actinomycetemcomitans* mostró diferencias significativas en las concentraciones obtenidas entre las dos superficies, con una concentración significativamente mayor en los implantes de superficie de rugosidad moderada [$5,57 \times 10^7$ UFC/mL (DE= $1,59 \times 10^7$ UFC/mL)] en comparación con los implantes de superficie de rugosidad mínima [$3,02 \times 10^7$ UFC/mL (DE = $1,37 \times 10^7$ UFC/mL); $p=0,002$] (Tabla 4; Figura 24).

Bacteria	Rugosidad de superficie	Media	Desviación estándar	Diferencia de medias	Límite de confianza 95% para diferencia de medias		Valor p
					Límite superior	Límite inferior	
<i>S. oralis</i> (UFC/mL)	Moderada	2,66x10 ⁷	1,18x10 ⁷	-1,77x10 ⁶	-1,46x10 ⁷	1,11x10 ⁷	0,775
	Mínima	2,84x10 ⁷	1,39x10 ⁷				
<i>A. naeslundii</i> (UFC/mL)	Moderada	3,13x10 ⁵	1,04x10 ⁵	4,86x10 ⁴	-9,87x10 ⁴	1,96x10 ⁵	0,495
	Mínima	2,65x10 ⁵	1,81x10 ⁵				
<i>V. parvula</i> (UFC/mL)	Moderada	1,99x10 ⁷	7,51x10 ⁶	-4,16x10 ⁶	-2,08x10 ⁷	1,25x10 ⁷	0,586
	Mínima	2,40x10 ⁷	2,12x10 ⁷				
<i>F. nucleatum</i> (UFC/mL)	Moderada	9,31x10 ⁶	3,08x10 ⁶	4,43x10 ⁶	1,06x10 ⁶	7,80x10 ⁶	0,013
	Mínima	4,88x10 ⁶	3,64x10 ⁶				
<i>P. gingivalis</i> (UFC/mL)	Moderada	1,43x10 ⁷	3,70x10 ⁶	1,99x10 ⁶	-5,19x10 ⁶	9,18x10 ⁶	0,564
	Mínima	1,23x10 ⁷	9,47x10 ⁶				
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (UFC/mL)	Moderada	5,57x10 ⁷	1,59x10 ⁷	2,55x10 ⁷	1,07x10 ⁷	4,04x10 ⁷	0,002
	Mínima	3,02x10 ⁷	1,37x10 ⁷				
Bacterias totales	Moderada	1,26x10 ⁸	2,38x10 ⁷	2,61x10 ⁷	1,91x10 ⁶	5,02x10 ⁷	0,036
	Mínima	1,00x10 ⁸	2,45x10 ⁷				

Tabla 4. Comparación del efecto de la rugosidad de superficie (rugosidad mínima y rugosidad moderada) de implantes dentales sobre la concentración de las seis especies bacterianas y bacterias totales expresadas en UFC/mL.

Teniendo en cuenta la cantidad total de bacterias acumuladas en ambas microtopografías de superficie de los implantes en estudio (obtenida por la suma de cada bacteria individual en cada una de las dos rugosidades), pudo observarse que la superficie de rugosidad moderada acumuló un número significativamente mayor de bacterias [(1,26x10⁸ UFC/mL (DE=2,38x10⁷ UFC/mL)] que la superficie de rugosidad mínima [1,00x10⁸ UFC/mL (DE=2,45x10⁷ UFC/mL)] (p=0,036) (Tabla 4).

Resultados

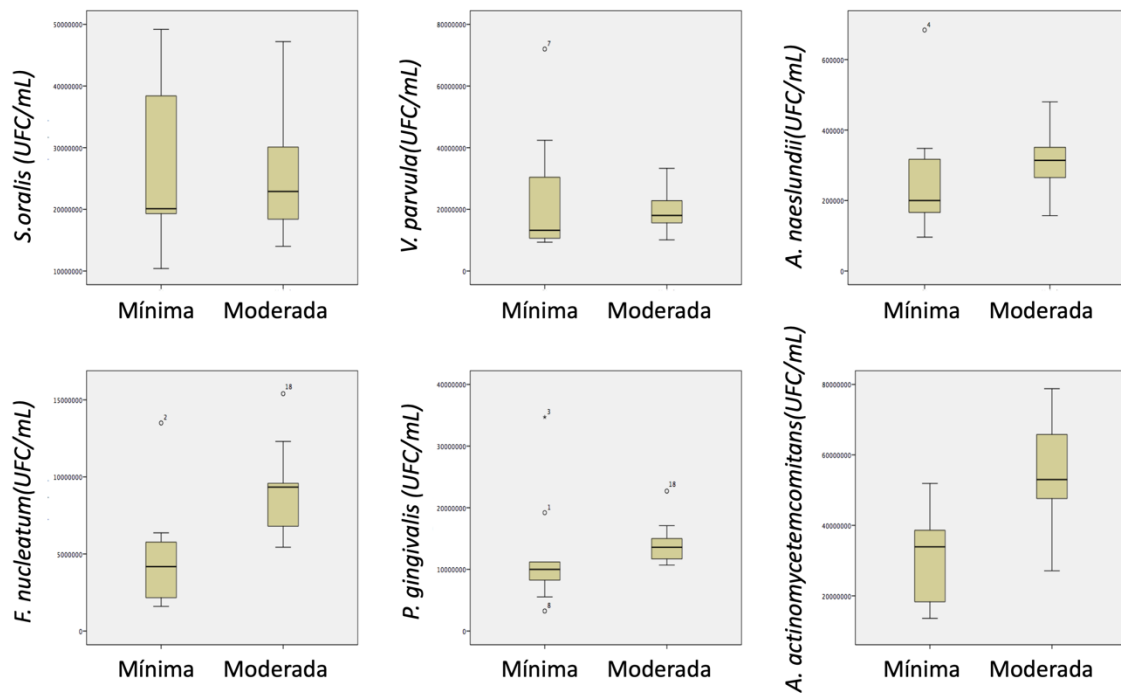


Figura 26. Distribución de datos después del análisis estadístico del número de bacterias expresadas como UFC/mL en implantes dentales con diferente rugosidad de superficie, superficie de rugosidad mínima (n=9) y superficie de rugosidad moderada (n=9), obtenida por qPCR a partir de biofilms de 96 horas de incubación, utilizando cebadores y sondas específicos dirigidos al gen 16S rRNA. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas superficies para las bacterias *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* (*, $p < 0,05$).

Discusión



La investigación llevada a cabo en la presente tesis doctoral ha permitido el estudio del impacto de la superficie de implantes dentales de titanio sobre el biofilm subgingival gracias al análisis del comportamiento de un modelo *in vitro* de biofilm multiespecie formado sobre superficies de implantes dentales en su forma comercial con su macro y microestructuras, describiendo la dinámica de formación, estructura y disposición de las células bacterianas, así como la evaluación de las consecuencias tanto cuantitativas como cualitativas del grado de rugosidad superficial en la acumulación bacteriana.

1 Influencia de la macro y microtopografía del implante en la estructura, morfología y dinámica del biofilm oral

En la primera fase de investigación de las dos que constituyen la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo el estudio del posible impacto que ejercen la macro y microestructura superficiales del implante dental de titanio sobre la formación del biofilm subgingival. Con este fin, se escogió la utilización de un modelo *in vitro* de biofilm oral multiespecie que permitió la evaluación de su dinámica de formación y de su maduración sobre la superficie de implantes de titanio en su forma comercial usando para ello medio de cultivo BHI modificado. Este medio de cultivo es uno de los factores clave en el desarrollo *in vitro* del biofilm ya que influye fuertemente en la agregación y co-agregación bacterianas. Se trata de un medio de cultivo complejo con una alta proporción de proteínas, que reproduce el carbono y las fuentes de energía disponibles para las bacterias dentro de la cavidad oral (Sanchez et al., 2011).

Los resultados obtenidos mostraron la colonización de la superficie del implante por parte de las seis especies bacterianas empleadas en el modelo *in vitro* de biofilm oral en un corto período de tiempo encontrándose todas ellas presentes desde las 12 horas; a medida que el tiempo de incubación aumentó, su disposición y estructura evolucionaron dando lugar a un biofilm maduro y bien estructurado. Dependiendo de la ubicación sobre la superficie del implante, este biofilm mostró diferentes proporciones en la viabilidad bacteriana, albergando

Discusión

más bacterias vivas en los picos de las espiras y más bacterias muertas en las superficies localizadas entre espiras, es decir, en los valles.

En la actualidad, las investigaciones llevadas a cabo con implantes dentales completos, es decir, en su forma comercial, para el estudio de la dinámica de formación del biofilm oral y de la estructura de la colonización microbiana son realmente escasas. Schmidt y colaboradores utilizaron implantes dentales completos en el seno de su investigación, sin embargo, el objetivo de la misma no fue el de analizar su influencia sobre la formación del biofilm, sino que los autores buscaban el estudio de la eficacia *in vitro* de diferentes modalidades de desbridamiento mecánico en la formación del biofilm en el cuello del implante (Schmidt et al., 2017). Por otro lado, si bien ya se ha estudiado la adhesión *in vitro* de bacterias comensales y patógenas a implantes dentales completos de titanio en su forma comercial (Di Giulio et al., 2016, Narendrakumar et al., 2015) las especies bacterianas empleadas, sin embargo, se analizaron de forma independiente como un biofilm monoespecie, obviando las relaciones interespecie y las asociaciones bacterianas en el seno del biofilm.

La comparación tanto cuantitativa como cualitativa del biofilm analizado en la presente tesis doctoral con investigaciones previas que evalúan la formación de biofilms en superficies de implantes es, por tanto, difícil, ya que la mayor parte de los estudios llevados a cabo en la misma línea de investigación han utilizado muestras de implantes dentales que contenían la superficie de titanio en estudio, como pueden ser discos, pero que no presentaban la macroestructura típica de un implante en su forma comercial, con sus espiras, picos y valles (Guggenheim et al., 2001a, Lin et al., 2013, Narendrakumar et al., 2015, Park et al., 2014, Rath et al., 2017, Roehling et al., 2017, Sanchez et al., 2014, Schmidlin et al., 2013, Violant et al., 2014).

El estudio cualitativo de los biofilms gracias al uso de microscopía confocal o CLSM reveló que los biofilms desarrollados en las primeras horas de incubación no cubrían uniformemente la superficie total del implante, sino que más bien las células bacterianas aparecieron dispersas adheridas a lo largo de toda la superficie del implante organizadas como agregados multicelulares. Estos

resultados son comparables con los obtenidos en estudios previos sobre muestras de discos en los que, en las primeras horas de incubación, puede apreciarse como las bacterias se encuentran agrupadas formando pequeños agregados multicelulares (Sanchez et al., 2014, Al-Ahmad et al., 2013). Cabe remarcar que, con el paso de las horas, a medida que el tiempo de incubación avanzaba y el biofilm se conformaba y maduraba (96 horas), la mayoría de las bacterias vivas se encontraron presentes en el pico de la espira y que la parte más profunda del área que se forma entre ellas, es decir, el valle, acumuló mayores cantidades de bacterias muertas, reflejando posiblemente la menor disponibilidad de nutrientes en esta zona menos accesible. Además, podría afirmarse que las altas fluctuaciones en la proporción de bacterias vivas con respecto a las bacterias muertas durante el transcurso de los diferentes tiempos de incubación probablemente reflejan la capacidad de las células vivas para obtener nutrición de las células bacterianas muertas.

Otros estudios sobre la morfología del biofilm en superficies de implantes llevados a cabo en dispositivos en forma de discos, mostraron diferencias con respecto a los resultados obtenidos sobre superficies de implantes en su forma comercial. Sánchez et al. en su estudio sobre la formación del biofilm en discos de titanio y zirconio empleando el mismo inóculo bacteriano multiespecie (Sanchez et al., 2014), observaron que los biofilms resultantes formaron una masa densa continua, que cubrió toda la superficie de los dispositivos utilizados. Burgers (Burgers et al., 2010) en su estudio morfológico de la formación de biofilms *in vivo* e *in vitro* en dos superficies diferentes de implantes de titanio también advirtió una capa bacteriana similar a Sánchez, homogénea y continua, que cubría toda la superficie de los discos de titanio.

Gracias al uso de MEB, pudo evaluarse la morfología tridimensional del biofilm. Analizando las imágenes obtenidas se observó como, a medida que el biofilm maduraba con el paso de las horas de incubación, las comunidades microbianas comenzaban a unirse formando cúmulos bacterianos que quedaban recubiertos por la matriz extracelular, entre los que aparecieron amplios canales de comunicación intercalados. Una estructura similar ha sido descrita por otros

Discusión

autores que estudian la formación de biofilms en diferentes superficies de implantes (Sanchez et al., 2014). Estos estudios mostraron una capa gruesa de biofilm recubriendo toda la superficie de los discos de titanio con microcolonias aglomeradas en grandes cúmulos bacterianos y amplios canales de comunicación entre ellos. Estos resultados sugieren que la morfología y organización del biofilm puede depender más de las características de la microtopografía de la superficie de los implantes que de la macrotopografía de este. En algunas imágenes obtenidas (Figura 16), pudo observarse como la matriz extracelular parecía debilitada y a cierta distancia de las células bacterianas, lo que podría deberse al tratamiento de las muestras que requiere el análisis por microscopía electrónica de barrido. El procesamiento de las muestras incluye un paso de deshidratación a través de una serie de soluciones de etanol graduadas, que puede afectar a la composición y el grosor de los exopolisacáridos que forman parte de la membrana extracelular ya que el agua es uno de sus componentes principales. En investigaciones previas realizadas por el grupo de investigación ETEP de la UCM en las que se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido a baja temperatura (LT-SEM, por sus siglas en inglés, *Low Temperature Scanning Electron Microscopy*) para el estudio de la misma composición bacteriana en un modelo de biofilm *in vitro*, la estructura del biofilm y la relación entre las células bacterianas y la matriz extracelular de polisacáridos no se vieron afectadas (Sanchez et al., 2014). Estas discrepancias, por lo tanto, pueden explicarse por el uso de MEB a temperatura ambiente, con una menor conservación de la muestra, en comparación con LT-SEM, ya que en esta última técnica las muestras congeladas e hidratadas retienen la mayor parte de su agua, se inmovilizan y estabilizan rápidamente con criofijación, y no están expuestas a modificaciones químicas o extracción con solventes.

La disposición del biofilm en la superficie del implante observada por MEB fue confirmada por la técnica de CLSM, donde las colonias aparecen a lo largo de toda la superficie del implante como agregados multicelulares. A pesar de que la estructura observada en el biofilm desarrollado (microcolonias apiladas en cúmulos bacterianos, matriz extracelular y canales de comunicación) no varía en función de la macroestructura de la superficie colonizada (implante en su forma

comercial, disco, etc.)(Sanchez et al., 2014), la disposición sobre la superficie sí difiere, lo cual indica que el biofilm sí puede verse afectado por la macroestructura típica del implante dental.

La dinámica de formación de los biofilms analizada por qPCR, mostró que las seis especies bacterianas empleadas en el modelo de biofilm oral empleado para la investigación se encontraban incorporadas al biofilm desde las primeras 12 horas de incubación, datos ya confirmados previamente por otros autores con investigaciones tanto *in vitro* e *in vivo*. Schmidlin y colaboradores, utilizando un modelo de biofilm multiespecie *in vitro* observó que la adhesión bacteriana a la superficie de titanio se daba desde incluso los 20 minutos de incubación (Schmidlin et al., 2013). Del mismo modo, Guggenheim y colaboradores utilizando un modelo de biofilm oral *in vitro* compuesto por *A. naeslundii*, *Veillonella dispar*, *F. nucleatum*, *Streptococcus sobrinus* y *S. oralis*, detectaron cada una de las especies bacterianas empleadas, incorporadas al biofilm tan sólo 15 minutos después de la inoculación (Guggenheim et al., 2001b).

Estos resultados cuantitativos obtenidos a través del recuento bacteriano mostraron las mayores concentraciones bacterianas a las 96 horas de incubación. En este momento (96 horas) el biofilm mostró una alta reproducibilidad, en comparación con el modelo de biofilm previamente publicado desarrollado en discos de titanio, zirconio o hidroxiapatita (Sanchez et al., 2014) (Tabla 3). Los altos valores de los coeficientes de variación mostrados en la correspondiente tabla podrían quedar explicados por la complejidad que ofrece un biofilm vivo (Sanchez et al., 2011, Socransky et al., 1998).

El presente estudio mostró que los colonizadores secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*) ya estaban presentes desde las primeras 12 horas de incubación en altas concentraciones. Resultados similares fueron obtenidos por otras investigaciones *in vivo* (Furst et al., 2007) quienes encontraron una colonización bacteriana de la superficie del implante 30 minutos después de la colocación de este, permaneciendo la misma carga bacteriana durante la primera semana. A partir de los primeros 7 días, esta carga bacteriana comienza a aumentar significativamente con el tiempo y, a los

12 meses, parece ser significativamente mayor en comparación con el momento de la implantación (Salvi et al., 2008).

Por otro lado, durante la primera fase de la investigación de la presente tesis doctoral, se valoró la posibilidad de usar un anclaje de metacrilato para permitir el soporte de los implantes exponiendo sólo el tercio coronal del implante con el fin de simular las condiciones *in vivo* de la cavidad oral donde las superficies expuestas del implante son las colonizadas por bacterias (Schwarz et al., 2007, Valente and Andreana, 2016, Zhang et al., 2014). Con este diseño, se observó que la topografía de superficie expuesta del implante fue colonizada por un biofilm maduro con características morfológicas y dinámicas similares a las de un biofilm maduro *in vivo*. Sin embargo, aunque existió acceso de las bacterias hasta la zona más apical del implante, incluida en el soporte, el biofilm formado era desestructurado y menos denso. Estos resultados plantean la necesidad de dirigir futuras investigaciones *in vitro* sobre biofilm formado alrededor de implantes en su forma comercial anclados en dispositivos por sus similitudes con la situación *in vivo*, antes de dar el paso a la investigación clínica, más compleja metodológica y económicamente.

2 Influencia cuantitativa y cualitativa de la rugosidad superficial del implante dental en un biofilm maduro

La segunda fase de investigación de la presente tesis doctoral se dirigió al estudio del impacto cuantitativo y cualitativo de la microtopografía superficial de implantes dentales de titanio en el biofilm subgingival mediante el análisis de la formación de un modelo *in vitro* de biofilm multiespecie de 96 horas de incubación sobre superficies de implantes en su forma comercial con dos microtopografías de superficie diferentes.

Los resultados obtenidos mostraron que, mientras cualitativamente los biofilms multiespecie crecieron en ambas superficies sin mostrar diferencias significativas al evaluarse por microscopía (CLSM y MEB), cuantitativamente sí se observaron diferencias. La cuantificación de la biomasa por CLSM permitió

registrar una mayor cantidad de bacterias en los implantes de rugosidad moderada cuando se compararon con los de mínima rugosidad (0,028 frente a 0,015 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, respectivamente). Gracias al recuento bacteriano mediante qPCR, pudo comprobarse un número significativamente mayor en las concentraciones de bacterias totales de una manera general, y en las concentraciones de *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* de manera más específica, en los implantes de rugosidad moderada en comparación con los implantes de rugosidad mínima.

La evaluación mediante CLSM reveló biofilms que consistían en microcolonias formadas mayoritariamente por bacterias vivas que se encontraban principalmente localizadas en las superficies laterales y los picos de las espiras de los implantes, quedando depósitos bacterianos mínimos en las áreas localizadas entre espiras, es decir, en los valles. En contraste con los resultados obtenidos, Matos y colaboradores (Matos et al., 2017) también utilizando CLSM para el análisis de un modelo de biofilm *in vitro* multiespecie compuesto de tres especies bacterianas sobre superficies de Ti, no encontraron ningún impacto de las diferentes superficies en la distribución de las microcolonias. En la misma línea de Matos, los patrones de CLSM descritos por Sánchez y colaboradores (Sanchez et al., 2014) en discos de titanio, describieron microcolonias bacterianas diseminadas por toda la superficie del disco, con diferencias mínimas en la deposición y distribución bacteriana cuando se compararon diferentes superficies de implantes. La distribución observada de las microcolonias en ambas microtopografías de superficie ya fue percibida previamente en la fase I del estudio en la que los dispositivos utilizados para el estudio del biofilm fueron implantes completos en su forma comercial. Por ello, es posible considerar que las características que definen a los biofilms identificados en esta investigación al comparar diferentes microtopografías de superficie en implantes en su forma comercial representen un modelo más cercano a la realidad clínica que cuando las muestras empleadas en los estudios son muestras que obvian la macro y microestructura de los implantes dentales, es decir, discos.

Discusión

Mediante el uso de MEB pudieron advertirse biofilms maduros en ambas superficies (rugosidad moderada y rugosidad mínima). La estructura de estos biofilms mostró células dispuestas en grandes comunidades bacterianas que, a su vez, se organizaron formando cúmulos de bacterias entre los que se abrían paso amplios canales de comunicación, todo ello rodeado de una gruesa matriz extracelular que cubría toda la superficie del implante. Una estructura morfológica similar ha sido observada en estudios previos dirigidos a la evaluación de la formación de biofilms sobre muestras de discos de Ti (Sanchez et al., 2014, Cavalcanti et al., 2016) sin tampoco encontrar diferencias estructurales en el biofilm cuando se compararon discos de Ti con diferentes microtopografías de superficie (Ferreira Ribeiro et al., 2016, Di Giulio et al., 2016, Scarano et al., 2004, Schmidlin et al., 2013, Pita et al., 2015).

Por otro lado, la utilización de MEB permitió también la puesta en evidencia de presencia bacteriana dentro de los poros superficiales, responsables de dotar de rugosidad a las diferentes superficies, en las muestras de implantes de rugosidad moderada, debido a que éstos presentan un mayor diámetro cuando se comparan con las superficies de mínima rugosidad. Resultados similares en la disposición de las células bacterianas del biofilm fueron obtenidos por Ferreira y colaboradores en su evaluación de la adhesión inicial bacteriana en discos de Ti con diferentes microtopografías de superficie (Ferreira Ribeiro et al., 2016). Los autores también observaron la presencia de bacterias dentro de los poros en las superficies de rugosidad moderada. Este hallazgo puede tener implicaciones no sólo en promover la acumulación de un mayor número de bacterias, sino también en aumentar, probablemente, la dificultad en su eliminación.

Los resultados cuantitativos obtenidos tanto por CLSM como por qPCR de la biomasa y de la concentración de bacterias totales respectivamente, dieron como resultado mayores cifras en implantes de superficie de rugosidad moderada cuando se compararon con los implantes de rugosidad mínima. Estos resultados confirman los obtenidos en estudios previos realizados por Bevilacqua y colaboradores (Bevilacqua et al., 2018) y Drago y colaboradores (Drago et al., 2016) en términos de biomasa y por Burgers y colaboradores (Burgers et al.,

2010) en términos de concentraciones bacterianas, lo que apoya la hipótesis de que las superficies de rugosidad moderada acumulan mayor cantidad de bacterias. Diferentes estudios *in vivo* dirigidos a analizar el impacto de las características de superficie de implantes dentales sobre los parámetros clínicos, apoyan también esta hipótesis y, por tanto, los resultados obtenidos (Xing et al., 2015, de Melo et al., 2017, Zhao et al., 2014).

Igualmente, en el análisis de las concentraciones bacterianas de una manera más específica, es decir, en la obtención de la concentración de cada una de las bacterias empleadas en el modelo de biofilm, los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron concentraciones significativamente más altas de *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* en la superficie de rugosidad moderada en comparación con los implantes de rugosidad mínima. Estos datos apoyan estudios precedentes con resultados similares afirmando que las superficies más rugosas no sólo acumulaban más bacterias sino que, además, se trataba de biofilms más patógenos en su composición (Subramani et al., 2009). De hecho, De Melo y colaboradores (de Melo et al., 2017), en un estudio *in vivo* sobre colonización bacteriana de superficies de implantes de Ti, no encontraron diferencias cuantitativas en el número de bacterias totales, pero sí encontraron diferencias en los recuentos de las bacterias más patógenas encontrando mayores cifras en las superficies de mayor rugosidad.

Existe cierta controversia en la literatura sobre el momento justo en el desarrollo del biofilm en el cual la rugosidad de la superficie podría tener un mayor impacto (adhesión, crecimiento o maduración). Ciertos estudios han señalado una mayor influencia en las primeras etapas (Dal Agnol et al., 2015, Al-Ahmad et al., 2010, Frojd et al., 2011, Lin et al., 2013), mientras que otros han demostrado un mayor impacto de las superficies más rugosas con cantidades crecientes de bacterias a medida que los biofilms se desarrollan y se vuelven maduros (John et al., 2015, Al-Ahmad et al., 2016). Esta disparidad evidencia la necesidad de estudios adicionales para identificar el punto crítico en el desarrollo del biofilm en el que la microtopografía de superficie puede tener un mayor impacto sobre su formación.

Es importante destacar que a pesar de que los implantes empleados comparten un diseño macroestructural similar (cuerpo cilíndrico con un ápice plano y acanalado), presentan entre ellos ciertas diferencias estructurales. Comparando los implantes de rugosidad mínima (3i Full OSSEOTITE® Certain® implants) frente a los de rugosidad moderada (Nobel Biocare Brånemark System® Mk III Groovy RP) pueden apreciarse diferencias en el paso de rosca (0,6 frente a 1,2mm, respectivamente), la longitud del cuerpo roscado (8,5 frente a 8,9mm respectivamente), en el diámetro mayor y menor del cuerpo roscado (3,25- 3,4 frente a 3,1-3,7mm, respectivamente) y en el diámetro del ápice (2,6 frente a 2,9mm, respectivamente). Puesto que resulta de gran dificultad comparar dos implantes en su forma comercial con exactamente las mismas características estructurales, la posible influencia de estas diferencias en la formación del biofilm de una manera cuantitativa no deben ser ignoradas, principalmente cuando se comparan una superficie de rugosidad moderada (Nobel Biocare Brånemark System® Mk III Groovy RP) con una superficie de rugosidad mínima (3i Full OSSEOTITE® Certain®).

3 Fortalezas y limitaciones de la investigación

La investigación llevada a cabo en el seno de la presente tesis doctoral muestra claras limitaciones debido a su diseño *in vitro*, derivadas principalmente de las diferencias existentes entre las condiciones de incubación y el entorno de la cavidad oral, por lo que su traducción a la realidad clínica debe interpretarse con cautela. Éstas son, entre otras, la ausencia del fluido crevicular y la respuesta del huésped a la presencia bacteriana. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la mayor parte de nuestro conocimiento sobre la formación de biofilms sobre superficies de implantes se basa en investigaciones *in vitro*, ya que involucran métodos sencillos y económicos que además no requieren del cumplimiento del paciente ni de consideraciones éticas (Roberts et al., 2015).

Asimismo, la selección de especies bacterianas en el modelo empleado se limita a sólo 6 bacterias representativas resultando, sin duda, escasa en comparación con la heterogeneidad del microbioma oral (Saeidnia et al., 2015).

Aunque el desarrollo de biofilms *in vivo* en dispositivos tales como discos puede compartir similitudes con la placa dental del paciente, el modelo de biofilm *in vitro* utilizado en esta tesis doctoral ha reunido un consorcio definido de especies bacterianas válido y altamente reproducible para estas comunidades bacterianas, considerando la heterogeneidad del microbioma oral (Ammann et al., 2013, Sanchez et al., 2014, Sanchez et al., 2019). De igual manera que las especies bacterianas seleccionadas en esta investigación ya han sido utilizadas con éxito en estudios previos sobre discos de hidroxiapatita, titanio y zirconio de nuestro grupo de investigación (Sanchez et al., 2017, Sanchez et al., 2014), otros autores apoyan también la presente selección bacteriana. En un estudio del microbioma de sitios peri-implantarios tanto sanos como enfermos (Sanz-Martin et al., 2017), utilizando la secuenciación de Illumina, los autores observaron que, mientras que el núcleo del microbioma asociado al sitio peri-implantario sano era rico en bacterias compatibles con la salud, como diferentes especies de *Streptococcus* y *V. parvula*; el núcleo asociado a peri-implantitis era rico en patógenos como *P. gingivalis* y miembros de los géneros *Fusobacterium*, entre otros, en acuerdo con la selección realizada en esta investigación. También respaldando el modelo empleado en la presente investigación, datos obtenidos por Maruyama y colaboradores (Maruyama et al., 2014), mostraron que *P. gingivalis* era abundante y prevalente en la mayoría de las muestras de peri-implantitis. Igualmente, la presencia de *A. actinomycetemcomitans* también está avalada por estudios previos que encontraron altos niveles de esta bacteria en numerosos casos de peri-implantitis (Leonhardt et al., 2003). En conjunto, los resultados muestran la importancia crítica del uso de combinaciones particulares de especies para los estudios de crecimiento comunitario multiespecie y apoyan firmemente el papel de las interacciones interespecie en la colonización repetitiva y secuencial de especies bacterianas orales en la formación de placa dental (Kolenbrander, 2011).

A pesar de las limitaciones derivadas de la naturaleza *in vitro* de la investigación, con la presente investigación se ha demostrado que el modelo de biofilm utilizado, que combina un biofilm multiespecie con el uso de superficies de implantes dentales en su forma comercial, tiene una clara ventaja sobre el uso

de biofilms monoespecie y su crecimiento en superficies planas (como por ejemplo discos) usados habitualmente para la investigación *in vitro*: los dispositivos empleados habitualmente presentan la rugosidad de superficie, pero obvian la macroestructura de éste quedando, por tanto, muy alejados de la realidad clínica.

4 Implicaciones de la investigación

El desarrollo de la presente tesis doctoral se ha dirigido hacia el estudio del impacto de las características superficiales, macro y microtopografía, de los implantes dentales de titanio sobre el biofilm subgingival. El modelo experimental empleado para la investigación está basado en la formación de un modelo *in vitro* de biofilm multiespecie sobre superficies de implantes dentales en su forma comercial. Los resultados obtenidos a través de este modelo han demostrado que la superficie de los implantes dentales de titanio afecta a la colonización bacteriana influyendo a la formación, estructura y disposición del biofilm.

Por un lado, se ha observado una variabilidad de la viabilidad del biofilm dependiente de la localización topográfica en la superficie implantaria, de manera que las bacterias vivas se han concentrado en su mayoría en el pico de la espira mientras que las bacterias muertas se encontraron mayoritariamente localizadas en el área del valle entre espiras, las cuales podrían comportarse como un reservorio nutricional para las células vivas.

Por otro lado, al comparar diferentes microtopografías de superficie, definidas por la rugosidad, se ha mostrado que, mientras cualitativamente la estructura y disposición del biofilm no presenta diferencias significativas entre ambas, cuantitativamente la superficie más rugosa no solo ha acumulado más bacteria sino también más patógena.

Es sabido que la topografía de superficie de implantes dentales de titanio modula una respuesta diferencial a células bacterianas y a células osteogénicas

(Pacha-Olivenza et al., 2019). El estudio de la modificación fisicoquímica de las propiedades superficiales del implante que consiga simultáneamente inhibir la colonización bacteriana y favorecer la promoción de las funciones de los osteoblastos resulta desafiante debido a la competencia en paralelo de bacterias y células tisulares por colonizar la misma superficie que, además, se encuentra interactuando con diferentes entidades biológicas que caracterizan el entorno *in vivo* (Neoh et al., 2012, Anitua et al., 2018). La metodología empleada en la realización de la presente tesis doctoral ha originado un entorno de investigación *in vitro* accesible y de gran utilidad para la búsqueda de respuestas sobre el impacto de nuevas características superficiales que favorezcan el crecimiento rápido y eficaz de las células implicadas en la osteointegración por encima de la adhesión bacteriana, antes de dar el salto a la investigación clínica.

Conclusiones



Teniendo en cuenta las limitaciones de la investigación *in vitro* y de su naturaleza observacional, la presente tesis doctoral ha demostrado que:

1. La superficie de los implantes dentales de titanio afecta a la colonización bacteriana y a la estructura del biofilm subgingival a través de un modelo *in vitro* de biofilm multiespecie sobre superficies de implantes dentales en su forma comercial.

2. Tanto la micro como la macrotopografía de superficie de implantes dentales de titanio afectan a la formación, estructura y disposición del biofilm bacteriano. Los implantes dentales utilizados en el modelo *in vitro* sufrieron una colonización bacteriana en un corto periodo de tiempo pudiendo desarrollarse un biofilm maduro y bien estructurado. La viabilidad celular de los biofilms desarrollados fue diferente dependiendo de la localización en el seno de la macroestructura del implante siendo el pico de la espira la zona con mayor presencia de bacterias vivas y el valle, localizado entre las espiras del implante, la zona con mayor presencia de bacterias muertas, las cuales podrían comportarse como un reservorio nutricional para las células vivas.

3. La microtopografía de superficie de los implantes dentales de titanio tiene consecuencias cuantitativas y cualitativas en la acumulación bacteriana. Los biofilms multiespecie crecieron en ambas superficies de implantes en estudio, rugosidad mínima y rugosidad moderada, sin diferencias estructurales o cualitativas significativas, sin embargo, cuantitativamente se obtuvo una biomasa significativamente mayor en los implantes de superficie de rugosidad moderada en comparación con los implantes de superficie de rugosidad mínima. La superficie más rugosa no sólo acumuló mayor cantidad de bacterias, sino que, además, éstas fueron más patógenas.

Bibliografía

ABISADO, R. G., BENOMAR, S., KLAUS, J. R., DANDEKAR, A. A. & CHANDLER, J. R. 2018. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *MBio*, 9.

AGUAYO, S., DONOS, N., SPRATT, D. & BOZEC, L. 2015. Nanoadhesion of *Staphylococcus aureus* onto Titanium Implant Surfaces. *Journal of Dental Research*, 94, 1078-84.

AL-AHMAD, A., KARYGIANNI, L., SCHULZE WARTENHORST, M., BACHLE, M., HELLWIG, E., FOLLO, M., VACH, K. & HAN, J. S. 2016. Bacterial adhesion and biofilm formation on yttria-stabilized, tetragonal zirconia and titanium oral implant materials with low surface roughness - an in situ study. *Journal of Medical Microbiology*, 65, 596-604.

AL-AHMAD, A., WIEDMANN-AL-AHMAD, M., FACKLER, A., FOLLO, M., HELLWIG, E., BACHLE, M., HANNIG, C., HAN, J. S., WOLKEWITZ, M. & KOHAL, R. 2013. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Archives of Oral Biology*, 58, 1139-47.

AL-AHMAD, A., WIEDMANN-AL-AHMAD, M., FAUST, J., BACHLE, M., FOLLO, M., WOLKEWITZ, M., HANNIG, C., HELLWIG, E., CARVALHO, C. & KOHAL, R. 2010. Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 95, 101-9.

ALBREKTSSON, T., BRANEMARK, P. I., HANSSON, H. A. & LINDSTROM, J. 1981. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 52, 155-70.

Bibliografía

ALBREKTSSON, T. & ISIDOR, F. Consensus report: implant therapy I. *In*: LANG NP, K. T., ed. Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology, 1994 Berlín. Quintessence, 365-369.

ALBREKTSSON, T., SENNERBY, L. & WENNERBERG, A. 2008. State of the art of oral implants. *Periodontology 2000*, 47, 15-26.

ALBREKTSSON, T. & WENNERBERG, A. 2004. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *International Journal of Prosthodontics*, 17, 536-43.

ALBREKTSSON, T., ZARB, G., WORTHINGTON, P. & ERIKSSON, A. R. 1986. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 1, 11-25.

AMMANN, T. W., BOSTANCI, N., BELIBASAKIS, G. N. & THURNHEER, T. 2013. Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research*, 48, 517-26.

ANITUA, E., TEJERO, R., PACHA-OLIVENZA, M. A., FERNANDEZ-CALDERON, M. C., DELGADO-RASTROLLO, M., ZALDUENDO, M. M., TROYA, M., PEREZ-GIRALDO, C. & GONZALEZ-MARTIN, M. L. 2018. Balancing microbial and mammalian cell functions on calcium ion-modified implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 106, 421-432.

ARAUJO, M. G. & LINDHE, J. 2018. Peri-implant health. *Journal of Periodontology*, 89 Suppl 1, S249-s256.

ATIEH, M. A., PAYNE, A. G., DUNCAN, W. J., DE SILVA, R. K. & CULLINAN, M. P. 2010. Immediate placement or immediate restoration/loading of single implants for molar tooth replacement: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 25, 401-15.

BERGLUNDH, T., ARMITAGE, G., ARAUJO, M. G., AVILA-ORTIZ, G., BLANCO, J., CAMARGO, P. M., CHEN, S., COCHRAN, D., DERKS, J., FIGUERO, E., HAMMERLE, C. H. F., HEITZ-MAYFIELD, L. J. A., HUYNH-BA, G., IACONO, V., KOO, K. T., LAMBERT, F., MCCAULEY, L., QUIRYNEN, M., RENVERT, S., SALVI, G. E., SCHWARZ, F., TARNOW, D., TOMASI, C., WANG, H. L. & ZITZMANN, N. 2018a. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45 Suppl 20, S286-s291.

BERGLUNDH, T., ARMITAGE, G., ARAUJO, M. G., AVILA-ORTIZ, G., BLANCO, J., CAMARGO, P. M., CHEN, S., COCHRAN, D., DERKS, J., FIGUERO, E., HAMMERLE, C. H. F., HEITZ-MAYFIELD, L. J. A., HUYNH-BA, G., IACONO, V., KOO, K. T., LAMBERT, F., MCCAULEY, L., QUIRYNEN, M., RENVERT, S., SALVI, G. E., SCHWARZ, F., TARNOW, D., TOMASI, C., WANG, H. L. & ZITZMANN, N. 2018b. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89 Suppl 1, S313-s318.

BERGLUNDH, T., JEPSEN, S., STADLINGER, B. & TERHEYDEN, H. 2019. Peri-implantitis and its prevention. *Clinical Oral Implants Research*, 30, 150-155.

BERGLUNDH, T., PERSSON, L. & KLINGE, B. 2002. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry

reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 Suppl 3, 197-212.

BEVILACQUA, L., MILAN, A., DEL LUPO, V., MAGLIONE, M. & DOLZANI, L. 2018. Biofilms Developed on Dental Implant Titanium Surfaces with Different Roughness: Comparison Between In Vitro and In Vivo Studies. *Current Microbiology*, 75, 766-772.

BOWEN, W. H., BURNE, R. A., WU, H. & KOO, H. 2018. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends in Microbiology*, 26, 229-242.

BRAGG, L. & TYSON, G. W. 2014. Metagenomics using next-generation sequencing. *Methods in Molecular Biology*, 1096, 183-201.

BRANDA, S. S., VIK, S., FRIEDMAN, L. & KOLTER, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, 20-6.

BRANEMARK, P. I. 1983. Osseointegration and its experimental background. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 50, 399-410.

BURGERS, R., GERLACH, T., HAHNEL, S., SCHWARZ, F., HANDEL, G. & GOSAU, M. 2010. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 21, 156-64.

CARROUEL, F., VIENNOT, S., SANTAMARIA, J., VEBER, P. & BOURGEOIS, D. 2016. Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. *Frontiers in Microbiology*, 7, 840.

CATON, J. G., ARMITAGE, G., BERGLUNDH, T., CHAPPLE, I. L. C., JEPSEN, S., KORNMAN, K. S., MEALEY, B. L., PAPAPANOU, P. N., SANZ, M. & TONETTI, M. S. 2018. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, 89 Suppl 1, S1-s8.

CAVALCANTI, Y. W., WILSON, M., LEWIS, M., WILLIAMS, D., SENNA, P. M., DEL-BEL-CURY, A. A. & DA SILVA, W. J. 2016. Salivary pellicles equalise surfaces' charges and modulate the virulence of *Candida albicans* biofilm. *Archives of Oral Biology*, 66, 129-40.

CHAN, D., PELEKOS, G., HO, D., CORTELLINI, P. & TONETTI, M. S. 2019. The depth of the implant mucosal tunnel modifies the development and resolution of experimental peri-implant mucositis: A case-control study. *Journal of Clinical Periodontology*, 46, 248-255.

CHRCANOVIC, B. R., ALBREKTSSON, T. & WENNERBERG, A. 2014. Reasons for failures of oral implants. *Journal of Oral Rehabilitation*, 41, 443-76.

CORDEIRO, J. M. & BARAO, V. A. 2017. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 71, 1201-1215.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. & LAPPIN-SCOTT, H. M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711-45.

DAL AGNOL, C. Z., STEFENON, L., VAN DE SANDE, F. H., DELLA BONA, Á., CENCI, M. S., WEBBER, B., RODRIGUES, L. B. & SANTOS, L. R. D. 2015. Microcosm Biofilm Formation on Titanium Surfaces. *Materials Research*, 18, 677-682.

Bibliografía

DARVEAU, R. P. 2010. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 481-90.

DE AVILA, E. D., LIMA, B. P., SEKIYA, T., TORII, Y., OGAWA, T., SHI, W. & LUX, R. 2015. Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium implant material. *Biomaterials*, 67, 84-92.

DE BRUYN, H., CHRISTIAENS, V., DOORNEWAARD, R., JACOBSSON, M., COSYN, J., JACQUET, W. & VERVAEKE, S. 2017. Implant surface roughness and patient factors on long-term peri-implant bone loss. *Periodontology 2000*, 73, 218-227.

DE MELO, F., DO NASCIMENTO, C., SOUZA, D. O. & DE ALBUQUERQUE, R. F., JR. 2017. Identification of oral bacteria on titanium implant surfaces by 16S rDNA sequencing. *Clinical Oral Implants Research*, 28, 697-703.

DERKS, J. & TOMASI, C. 2015. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *Journal of Clinical Periodontology*, 42 Suppl 16, S158-71.

DEWHIRST, F. E., CHEN, T., IZARD, J., PASTER, B. J., TANNER, A. C., YU, W. H., LAKSHMANAN, A. & WADE, W. G. 2010. The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192, 5002-17.

DI GIULIO, M., TRAINI, T., SINJARI, B., NOSTRO, A., CAPUTI, S. & CELLINI, L. 2016. Porphyromonas gingivalis biofilm formation in different titanium surfaces, an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research*, 27, 918-25.

DO, T., DEVINE, D. & MARSH, P. D. 2013. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 5, 11-9.

DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 167-93.

DRAGO, L., BORTOLIN, M., DE VECCHI, E., AGRAPPI, S., WEINSTEIN, R. L., MATTINA, R. & FRANCETTI, L. 2016. Antibiofilm activity of sandblasted and laser-modified titanium against microorganisms isolated from peri-implantitis lesions. *Journal of Chemotherapy*, 28, 383-9.

ESCOBAR-ZEPEDA, A., VERA-PONCE DE LEON, A. & SANCHEZ-FLORES, A. 2015. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 6, 348.

FERREIRA RIBEIRO, C., COGO-MULLER, K., FRANCO, G. C., SILVA-CONCILIO, L. R., SAMPAIO CAMPOS, M., DE MELLO RODE, S. & CLARO NEVES, A. C. 2016. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Archives of Oral Biology*, 69, 33-9.

FERRER, M. D. & MIRA, A. 2016. Oral Biofilm Architecture at the Microbial Scale. *Trends in Microbiology*, 24, 246-248.

FRANKLIN, M. J., CHANG, C., AKIYAMA, T. & BOTHNER, B. 2015. New Technologies for Studying Biofilms. *Microbiology Spectrum*, 3.

FROJD, V., CHAVEZ DE PAZ, L., ANDERSSON, M., WENNERBERG, A., DAVIES, J. R. & SVENSATER, G. 2011. In situ analysis of multispecies biofilm

Bibliografía

formation on customized titanium surfaces. *Molecular Oral Microbiology*, 26, 241-52.

FURST, M. M., SALVI, G. E., LANG, N. P. & PERSSON, G. R. 2007. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*, 18, 501-8.

GECKILI, O., BILHAN, H., GECKILI, E., CILINGIR, A., MUMCU, E. & BURAL, C. 2014. Evaluation of possible prognostic factors for the success, survival, and failure of dental implants. *Implant Dentistry*, 23, 44-50.

GUGGENHEIM, B., GIERTSEN, E., SCHUPBACH, P. & SHAPIRO, S. 2001a. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *Journal of Dental Research*, 80, 363-70.

GUGGENHEIM, M., SHAPIRO, S., GMUR, R. & GUGGENHEIM, B. 2001b. Spatial arrangements and associative behavior of species in an in vitro oral biofilm model. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1343-50.

GUTWEIN, L. G. & WEBSTER, T. J. 2004. Increased viable osteoblast density in the presence of nanophase compared to conventional alumina and titania particles. *Biomaterials*, 25, 4175-83.

HAFFAJEE, A. D., SOCRANSKY, S. S., PATEL, M. R. & SONG, X. 2008. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*, 23, 196-205.

HAJISHENGALLIS, G. 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*, 35, 3-11.

HAJISHENGALLIS, G., DARVEAU, R. P. & CURTIS, M. A. 2012. The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 717-25.

HAJISHENGALLIS, G. & LAMONT, R. J. 2012. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, 27, 409-19.

HAJISHENGALLIS, G., LIANG, S., PAYNE, M. A., HASHIM, A., JOTWANI, R., ESKAN, M. A., MCINTOSH, M. L., ALSAM, A., KIRKWOOD, K. L., LAMBRIS, J. D., DARVEAU, R. P. & CURTIS, M. A. 2011. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host & Microbe*, 10, 497-506.

HEITZ-MAYFIELD, L. J., SALVI, G. E., BOTTICELLI, D., MOMBELLI, A., FADDY, M. & LANG, N. P. 2011. Anti-infective treatment of peri-implant mucositis: a randomised controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*, 22, 237-41.

HERRLING, M. P., WEISBRODT, J., KIRKLAND, C. M., WILLIAMSON, N. H., LACKNER, S., CODD, S. L., SEYMOUR, J. D., GUTHAUSEN, G. & HORN, H. 2017. NMR investigation of water diffusion in different biofilm structures. *Biotechnology and Bioengineering*, 114, 2857-2867.

ISLER, S. C., URAZ, A., KAYMAZ, O. & CETINER, D. 2019. An Evaluation of the Relationship Between Peri-implant Soft Tissue Biotype and the Severity of Peri-implantitis: A Cross-Sectional Study. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 34, 187-196.

JAMAL, M., AHMAD, W., ANDLEEB, S., JALIL, F., IMRAN, M., NAWAZ, M. A., HUSSAIN, T., ALI, M., RAFIQ, M. & KAMIL, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81, 7-11.

Bibliografía

JEPSEN, S., BERGLUNDH, T., GENCO, R., AASS, A. M., DEMIREL, K., DERKS, J., FIGUERO, E., GIOVANNOLI, J. L., GOLDSTEIN, M., LAMBERT, F., ORTIZ-VIGON, A., POLYZOIS, I., SALVI, G. E., SCHWARZ, F., SERINO, G., TOMASI, C. & ZITZMANN, N. U. 2015. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42 Suppl 16, S152-7.

JEPSEN, S., RUHLING, A., JEPSEN, K., OHLENBUSCH, B. & ALBERS, H. K. 1996. Progressive peri-implantitis. Incidence and prediction of peri-implant attachment loss. *Clinical Oral Implants Research*, 7, 133-42.

JOHN, G., BECKER, J. & SCHWARZ, F. 2015. Modified implant surface with slower and less initial biofilm formation. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 17, 461-8.

KLINGE, B., KLINGE, A., BERTL, K. & STAVROPOULOS, A. 2018. Peri-implant diseases. *European Journal of Oral Sciences*, 126 Suppl 1, 88-94.

KOLENBRANDER, P. E. 2011. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *International Journal of Oral Science*, 3, 49-54.

LANG, N. P., BERGLUNDH, T. & ON BEHALF OF WORKING GROUP 4 OF THE SEVENTH EUROPEAN WORKSHOP ON, P. 2011. Periimplant diseases: where are we now? – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38, 178-181.

LARSEN, T. & FIEHN, N. E. 2017. Dental biofilm infections - an update. *Apmis*, 125, 376-384.

LASSERRE, J. F., BRECX, M. C. & TOMA, S. 2018. Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Materials (Basel)*, 11.

LE GUEHENNEC, L., SOUEIDAN, A., LAYROLLE, P. & AMOURIQ, Y. 2007. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 23, 844-54.

LEONHARDT, A., DAHLEN, G. & RENVERT, S. 2003. Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. *Journal of Periodontology*, 74, 1415-22.

LIN, H. Y., LIU, Y., WISMEIJER, D., CRIELAARD, W. & DENG, D. M. 2013. Effects of oral implant surface roughness on bacterial biofilm formation and treatment efficacy. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 28, 1226-31.

LIN, N. J. 2017. Biofilm over teeth and restorations: What do we need to know? *Dental Materials*, 33, 667-680.

MARIN, M. J., AMBROSIO, N., HERRERA, D., SANZ, M. & FIGUERO, E. 2018. Validation of a multiplex qPCR assay for the identification and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: In vitro and subgingival plaque samples. *Archives of Oral Biology*, 88, 47-53.

MARIN, M. J., FIGUERO, E., HERRERA, D. & SANZ, M. 2017. Quantitative Analysis of Periodontal Pathogens Using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). *Methods in Molecular Biology*, 1537, 191-202.

MARSH, P. D., DO, T., BEIGHTON, D. & DEVINE, D. A. 2016. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70, 80-92.

MARUYAMA, N., MARUYAMA, F., TAKEUCHI, Y., AIKAWA, C., IZUMI, Y. & NAKAGAWA, I. 2014. Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. *Scientific Reports*, 4, 6602.

MATOS, A., RICOMINI-FILHO, A., BELINE, T., OGAWA, E., COSTA-OLIVEIRA, B., DE ALMEIDA, A., NOCITI JUNIOR, F., RANGEL, E., DA CRUZ, N., SUKOTJO, C., MATHEW, M. & BARÃO, V. 2017. Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 354-366.

MCLEAN, J. S. 2014. Advancements toward a systems level understanding of the human oral microbiome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 98.

MEIRELLES, L., ARVIDSSON, A., ALBREKTSSON, T. & WENNERBERG, A. 2007. Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*, 18, 326-32.

MEYER, S., GIANNOPOULOU, C., COURVOISIER, D., SCHIMMEL, M., MULLER, F. & MOMBELLI, A. 2017. Experimental mucositis and experimental gingivitis in persons aged 70 or over. Clinical and biological responses. *Clinical Oral Implants Research*, 28, 1005-1012.

NARENDRAKUMAR, K., KULKARNI, M., ADDISON, O., MAZARE, A., JUNKAR, I., SCHMUKI, P., SAMMONS, R. & IGLIC, A. 2015. Adherence of oral streptococci to nanostructured titanium surfaces. *Dental Materials*, 31, 1460-8.

NEOH, K. G., HU, X., ZHENG, D. & KANG, E. T. 2012. Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces. *Biomaterials*, 33, 2813-22.

NOBBS, A. H., LAMONT, R. J. & JENKINSON, H. F. 2009. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, 407-50.

ORTH, R. K., O'BRIEN-SIMPSON, N. M., DASHPER, S. G. & REYNOLDS, E. C. 2011. Synergistic virulence of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in a murine periodontitis model. *Molecular Oral Microbiology*, 26, 229-40.

OVERMAN, P. R. 2000. Biofilm: a new view of plaque. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 1, 18-29.

PACHA-OLIVENZA, M., #XC1, NGEL, TEJERO, R., FERN, #XE1, NDEZ-CALDER, #XF3, N, M., #XED, CORONADA, A., ANITUA, E., TROYA, M., #XED, GONZ, #XE1, LEZ-MART, #XED & N, M. L. 2019. Relevance of Topographic Parameters on the Adhesion and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts and Oral Bacterial Strains. *BioMed Research International*, 2019, 13.

PAPAVASILEIOU, D., BEHR, M., GOSAU, M., GERLACH, T. & BUERGERS, R. 2015. Peri-implant Biofilm Formation on Luting Agents Used for Cementing Implant-Supported Fixed Restorations: A Preliminary In Vivo Study. *International Journal of Prosthodontics*, 28, 371-3.

PARK, J. H., LEE, J. K., UM, H. S., CHANG, B. S. & LEE, S. Y. 2014. A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 44, 79-84.

PEREIRA, J., TAVARES, F., LIMA, K., CARREIRO, A., HENRIQUES, B., SILVA, F., NASCIMENTO, R., LOPEZ-LOPEZ, J. & SOUZA, J. 2015. Relation between Dental Implant Joint Surfaces and Biofilm Formation. *Dentistry*, 5, 296.

PIMENTEL, S. P., FONTES, M., RIBEIRO, F. V., CORREA, M. G., NISHII, D., CIRANO, F. R., CASATI, M. Z. & CASARIN, R. C. V. 2018. Smoking habit modulates peri-implant microbiome: A case-control study. *Journal of Periodontal Research*, 53, 983-991.

PITA, P. P., RODRIGUES, J. A., OTA-TSUZUKI, C., MIATO, T. F., ZENOBIO, E. G., GIRO, G., FIGUEIREDO, L. C., GONCALVES, C., GEHRKE, S. A., CASSONI, A. & SHIBLI, J. A. 2015. Oral Streptococci Biofilm Formation on Different Implant Surface Topographies. *BioMed Research International*, 2015, 6.

POLIZZI, G., GUALINI, F. & FRIBERG, B. 2013. A two-center retrospective analysis of long-term clinical and radiologic data of TiUnite and turned implants placed in the same mouth. *International Journal of Prosthodontics*, 26, 350-8.

QUIRYNEN, M., AL-NAWAS, B., MEIJER, H. J., RAZAVI, A., REICHERT, T. E., SCHIMMEL, M., STORELLI, S. & ROMEO, E. 2015. Small-diameter titanium Grade IV and titanium-zirconium implants in edentulous mandibles: three-year results from a double-blind, randomized controlled trial. *Clinical Oral Implants Research*, 26, 831-40.

RAMANAUSKAITE, A., BECKER, K. & SCHWARZ, F. 2018. Clinical characteristics of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 29, 551-556.

RASPERINI, G., MAGLIONE, M., COCCONCELLI, P. & SIMION, M. 1998. In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a

comparative microbiological and SEM analysis. *Clinical Oral Implants Research*, 9, 357-64.

RATH, H., STUMPP, S. N. & STIESCH, M. 2017. Development of a flow chamber system for the reproducible in vitro analysis of biofilm formation on implant materials. *PLoS One*, 12, e0172095.

READY, D., THEODORIDIS, G., GREEN, I., CIRIC, L., PRATTEN, J., TAY, W. & MCDONALD, A. 2015. In vitro evaluation of the antibiofilm properties of chlorhexidine and delmopinol on dental implant surfaces. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45, 662-6.

ROBERTS, A. E., KRAGH, K. N., BJARNSHOLT, T. & DIGGLE, S. P. 2015. The Limitations of In Vitro Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection. *Journal of Molecular Biology*, 427, 3646-61.

ROEHLING, S., ASTASOV-FRAUENHOFFER, M., HAUSER-GERSPACH, I., BRAISSANT, O., WOELFLER, H., WALTIMO, T., KNIHA, H. & GAHLERT, M. 2017. In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. *Journal of Periodontology*, 88, 298-307.

ROSSELLI, R., ROMOLI, O., VITULO, N., VEZZI, A., CAMPANARO, S., DE PASCALE, F., SCHIAVON, R., TIARCA, M., POLETTI, F., CONCHERI, G., VALLE, G. & SQUARTINI, A. 2016. Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon. *Scientific Reports*, 6.

RUPP, F., LIANG, L., GEIS-GERSTORFER, J., SCHEIDELER, L. & HUTTIG, F. 2018. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dental Materials*, 34, 40-57.

Bibliografía

SAEIDNIA, S., MANAYI, A. & ABDOLLAHI, M. 2015. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Current Drug Discovery Technologies*, 12, 218-24.

SAINI, R., SAINI, S. & SHARMA, S. 2011. Biofilm: A dental microbial infection. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2, 71-5.

SALVI, G. E., FURST, M. M., LANG, N. P. & PERSSON, G. R. 2008. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clinical Oral Implants Research*, 19, 242-8.

SAMARANAYAKE, L. & MATSUBARA, V. H. 2017. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. *Dental Clinics of North America*, 61, 199-215.

SANCHEZ, M. C., FERNANDEZ, E., LLAMA-PALACIOS, A., FIGUERO, E., HERRERA, D. & SANZ, M. 2017. Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. *Dental Materials*, 33, 446-453.

SANCHEZ, M. C., LLAMA-PALACIOS, A., BLANC, V., LEON, R., HERRERA, D. & SANZ, M. 2011. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research*, 46, 252-60.

SANCHEZ, M. C., LLAMA-PALACIOS, A., FERNANDEZ, E., FIGUERO, E., MARIN, M. J., LEON, R., BLANC, V., HERRERA, D. & SANZ, M. 2014. An in vitro biofilm model associated to dental implants: structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dental Materials*, 30, 1161-71.

SANCHEZ, M. C., TOLEDANO-OSORIO, M., BUENO, J., FIGUERO, E., TOLEDANO, M., MEDINA-CASTILLO, A. L., OSORIO, R., HERRERA, D. & SANZ, M. 2019. Antibacterial effects of polymeric PolymP-n Active nanoparticles. An in vitro biofilm study. *Dental Materials*, 35, 156-168.

SANZ, M., BEIGHTON, D., CURTIS, M. A., CURY, J. A., DIGE, I., DOMMISCH, H., ELLWOOD, R., GIACAMAN, R. A., HERRERA, D., HERZBERG, M. C., KONONEN, E., MARSH, P. D., MEYLE, J., MIRA, A., MOLINA, A., MOMBELLI, A., QUIRYNEN, M., REYNOLDS, E. C., SHAPIRA, L. & ZAURA, E. 2017. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44 Suppl 18, S5-S11.

SANZ-MARTIN, I., DOOLITTLE-HALL, J., TELES, R. P., PATEL, M., BELIBASAKIS, G. N., HAMMERLE, C. H. F., JUNG, R. E. & TELES, F. R. F. 2017. Exploring the microbiome of healthy and diseased peri-implant sites using Illumina sequencing. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, 1274-1284.

SCARANO, A., PIATTELLI, M., CAPUTI, S., FAVERO, G. A. & PIATTELLI, A. 2004. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *Journal of Periodontology*, 75, 292-6.

SCHMIDLIN, P. R., MULLER, P., ATTIN, T., WIELAND, M., HOFER, D. & GUGGENHEIM, B. 2013. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *Journal of Applied Oral Science*, 21, 48-55.

SCHMIDT, K. E., AUSCHILL, T. M., HEUMANN, C., FRANKENBERGER, R., EICK, S., SCULEAN, A. & ARWEILER, N. B. 2017. Influence of different instrumentation modalities on the surface characteristics and biofilm formation on dental implant neck, in vitro. *Clinical Oral Implants Research*, 28, 483-490.

Bibliografía

SCHOU, S., HOLMSTRUP, P., STOLTZE, K., HJORTING-HANSEN, E., FIEHN, N. E. & SKOVGAARD, L. T. 2002. Probing around implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingiva. A histologic comparison in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Clinical Oral Implants Research*, 13, 113-26.

SCHWARTZ-FILHO, H. O., MORANDINI, A. C., RAMOS-JUNIOR, E. S., JIMBO, R., SANTOS, C. F., MARCANTONIO, E., JR., WENNERBERG, A. & MARCANTONIO, R. A. 2012. Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100, 2629-36.

SCHWARZ, F., DERKS, J., MONJE, A. & WANG, H. L. 2018. Peri-implantitis. *Journal of Periodontology*, 89 Suppl 1, S267-s290.

SCHWARZ, F., HERTEN, M., SAGER, M., BIELING, K., SCULEAN, A. & BECKER, J. 2007. Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 18, 161-70.

SCHWARZ, F., MIHATOVIC, I., GOLUBOVIC, V., EICK, S., IGLHAUT, T. & BECKER, J. 2014. Experimental peri-implant mucositis at different implant surfaces. *Journal of Clinical Periodontology*, 41, 513-20.

SJODIN, T. 2019. The pH-dependent effect of cationic and non-ionic delmopinol on planktonic and biofilm bacteria. *Archives of Oral Biology*, 102, 101-105.

SMEETS, R., HENNINGSEN, A., JUNG, O., HEILAND, M., HAMMÄCHER, C. & STEIN, J. M. 2014. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head and Face Medicine*, 10, 34.

SMEETS, R., STADLINGER, B., SCHWARZ, F., BECK-BROICHSITTER, B., JUNG, O., PRECHT, C., KLOSS, F., GROBE, A., HEILAND, M. & EBKER, T. 2016. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *BioMed Research International*, 2016, 6285620.

SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., SMITH, C. & KENT, R. L., JR. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25, 134-44.

SOLANO, C., ECHEVERZ, M. & LASA, I. 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96-104.

SONG, F., KOO, H. & REN, D. 2015. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of Dental Research*, 94, 1027-34.

SRIDHAR, S., ABIDI, Z., WILSON, T. G., JR., VALDERRAMA, P., WADHWANI, C., PALMER, K. & RODRIGUES, D. C. 2016. In Vitro Evaluation of the Effects of Multiple Oral Factors on Dental Implants Surfaces. *Journal of Oral Implantology*, 42, 248-57.

SRIDHAR, S., WANG, F., WILSON, T. G., PALMER, K., VALDERRAMA, P. & RODRIGUES, D. C. 2019. The role of bacterial biofilm and mechanical forces in modulating dental implant failures. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 92, 118-127.

STREIT, W. R. & SCHMITZ, R. A. 2004. Metagenomics--the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 492-8.

SUAREZ MOYA, A. 2017. [Microbiome and next generation sequencing]. *Revista Española de Quimioterapia*, 30, 305-311.

Bibliografía

SUBRAMANI, K., JUNG, R. E., MOLENBERG, A. & HAMMERLE, C. H. 2009. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 24, 616-26.

TATAKIS, D. N. & KUMAR, P. S. 2005. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dental Clinics of North America*, 49, 491-516.

TELES, R., TELES, F., FRIAS-LOPEZ, J., PASTER, B. & HAFFAJEE, A. 2013. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*, 62, 95-162.

TEUGHEL, W., VAN ASSCHE, N., SLIEPEN, I. & QUIRYNEN, M. 2006. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17 Suppl 2, 68-81.

TOLKER-NIELSEN, T. 2015. Biofilm Development. *Microbiology Spectrum*, 3, Mb-0001-2014.

TONETTI, M. S., CHAPPLE, I. L., JEPSEN, S. & SANZ, M. 2015. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. *Journal of Clinical Periodontology*, 42 Suppl 16, S1-4.

VALENTE, N. A. & ANDREANA, S. 2016. Peri-implant disease: what we know and what we need to know. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 46, 136-51.

VIOLANT, D., GALOFRE, M., NART, J. & TELES, R. P. 2014. In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm on different implant surfaces. *Biomedical Materials*, 9, 035007.

WADE, W. G. 2011. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *Journal of Clinical Periodontology*, 38 Suppl 11, 7-16.

WENNERBERG, A. & ALBREKTSSON, T. 2009. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, 20 Suppl 4, 172-84.

WENNERBERG, A. & ALBREKTSSON, T. 2010. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 25, 63-74.

WENNERBERG, A., FROJD, V., OLSSON, M., NANNMARK, U., EMANUELSSON, L., JOHANSSON, P., JOSEFSSON, Y., KANGASNIEMI, I., PELTOLA, T., TIRRI, T., PANKALAINEN, T. & THOMSEN, P. 2011. Nanoporous TiO(2) thin film on titanium oral implants for enhanced human soft tissue adhesion: a light and electron microscopy study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 13, 184-96.

WHITELEY, M., DIGGLE, S. P. & GREENBERG, E. P. 2017. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551, 313-320.

WU-YUAN, C. D., EGANHOUSE, K. J., KELLER, J. C. & WALTERS, K. S. 1995. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *Journal of Oral Implantology*, 21, 207-13.

XING, R., LYGSTADAAS, S. P., ELLINGSEN, J. E., TAXT-LAMOLLE, S. & HAUGEN, H. J. 2015. The influence of surface nanoroughness, texture and chemistry of TiZr implant abutment on oral biofilm accumulation. *Clinical Oral Implants Research*, 26, 649-56.

Bibliografía

YEO, I. S., KIM, H. Y., LIM, K. S. & HAN, J. S. 2012. Implant surface factors and bacterial adhesion: a review of the literature. *International Journal of Artificial Organs*, 35, 762-72.

ZHANG, L., GERAETS, W., ZHOU, Y., WU, W. & WISMEIJER, D. 2014. A new classification of peri-implant bone morphology: a radiographic study of patients with lower implant-supported mandibular overdentures. *Clinical Oral Implants Research*, 25, 905-9.

ZHAO, B., VAN DER MEI, H. C., SUBBIAHDOSS, G., DE VRIES, J., RUSTEMA-ABBING, M., KUIJER, R., BUSSCHER, H. J. & REN, Y. 2014. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. *Dental Materials*, 30, 716-27.

ZITZMANN, N. U., ABRAHAMSSON, I., BERGLUNDH, T. & LINDHE, J. 2002. Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 29, 456-61.

Anexos



Artículo 1



Received: 17 July 2018 | Revised: 17 January 2019 | Accepted: 17 January 2019
DOI: 10.1111/clr.13409

ORIGINAL RESEARCH

WILEY CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

Topographic characterization of multispecies biofilms growing on dental implant surfaces: An in vitro model

Patricia Bermejo¹  | María Carmen Sánchez^{1,2} | Arancha Llama-Palacios^{1,2}  |
Elena Figueroa² | David Herrera²  | Mariano Sanz² 

¹Laboratory of Oral Microbiology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain

²ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, University Complutense, Madrid, Spain

Correspondence

Mariano Sanz, ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, Department of Dental Clinical Specialties, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain.
Email: marsan@ucm.es

Abstract

Objectives: To describe the early biofilm formation over whole dental implants with its micro- and macrostructure, using an in vitro multispecies biofilm model.

Material and methods: Six bacterial strains (*Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) were used to develop in vitro biofilms over whole titanium implants (growth times 12, 24, 48, 72, 96, and 120 hr). The morphology of biofilms was studied by confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy, and the bacterial dynamics through quantitative polymerase chain reaction. As primary outcome variable, numbers of each species [colony-forming units per milliliter (CFU/ml)] at different incubation times were compared using the one-way analysis of variance and *post hoc* testing with Bonferroni's correction. Furthermore, implants were fixed in methacrylate stents to reproduce the clinical situation and biofilms were developed and analyzed by scanning electron microscopy.

Results: Bacteria colonized implants in a short period of time. Biofilms reached a mature state at 96 hr, exhibiting different ratios of live/dead cells depending on their location, being the peaks of the threads the areas harboring more live bacteria. The densities of each bacteria fluctuated in time, reaching its maximum at 96 hr. Even though the coefficients of variation were high, percentages were similar to those published previously using implant surface specimens, rather than whole implants.

Conclusion: Dental implants can be colonized by different bacterial species, developing into a mature and well-structured biofilm, which depending on the location may exhibit different degree of bacterial vitality.

KEYWORDS

biofilm, CLSM, dental implants, peri-implant diseases, qPCR, SEM, titanium

1 | INTRODUCTION

Dental implants to rehabilitate the lost dentition are a well-accepted therapeutic tool, with long-term evidence of highly predictable survival rates. However, when implant surfaces are exposed to the oral

environment, these medical devices are subjected to the same microbial challenges as teeth and other artificial surfaces (Busscher, Rinastiti, Siswomihardjo, & van der Mei, 2010; Filoche, Wong, & Sissons, 2010; Sanchez et al., 2011). When inserted, implant surfaces are sterile, although the transmucosal components become exposed

to the oral environment and will immediately form a salivary-derived pellicle that will soon be colonized by oral bacteria forming biofilms. Depending on different environmental drivers, these biofilms may be simple and mainly composed of health-associated bacteria or if allowed to grow and mature, quantitative and qualitative changes in their bacterial composition and virulence will trigger an immune-inflammatory response in the peri-implant tissues, eventually leading to peri-implant diseases (Ferreira Ribeiro et al., 2016). These peri-implant diseases have a high prevalence, ranging from 19% to 65% for peri-implant mucositis and from 1% to 47% for peri-implantitis (Jung, Zembic, Pjetursson, Zwahlen, & Thoma, 2012; Quirynen, De Soete, & van Steenberghe, 2002; Roos-Jansaker, Lindahl, Renvert, & Renvert, 2006).

Since the key factor in the initiation of the peri-implant diseases is the formation of complex biofilms on the exposed implant surfaces, there is a high scientific interest on studying the ability of bacteria to adhere to different implant surfaces and to form complex biofilms. Most of the modern implant surfaces are made up of titanium (Ti) and Ti alloys, due to its biocompatibility and favorable bio-mechanical properties (Cordeiro & Barao, 2017; Long & Rack, 1998; Quirynen et al., 2015). Furthermore, specific microsurface topography with increased relative roughness and hydrophobicity has been developed to enhance the implant-tissue interactions. These complex surface topographies, which clearly enhance implant osseointegration, may also facilitate the development of complex biofilms and impair their cleanability (Ferreira Ribeiro et al., 2016; Di Giulio et al., 2016; Song, Koo, & Ren, 2015; Violant, Galofre, Nart, & Teles, 2014; Xing, Lyngstadaas, Ellingsen, Taxt-Lamolle, & Haugen, 2015). Previous in vitro research on implant surfaces has shown that roughness, surface free energy, wettability, and degree of sterilization may affect biofilm formation, bacterial three-dimensional distribution, and antimicrobial treatment efficacy (Al-Ahmad et al., 2010; Di Giulio et al., 2016; Lin, Liu, Wismeijer, Crielaard, & Deng, 2013; Schmidlin et al., 2013; Song et al., 2015; Yeo, Kim, Lim, & Han, 2012). These studies have used specimens, such as disks or slabs containing the studied surface (Aguayo, Donos, Spratt, & Bozec, 2015; de Avila et al., 2015; Di Giulio et al., 2016; Papavasileiou, Behr, Gosau, Gerlach, & Buerger, 2015; Pita et al., 2015; Ready et al., 2015), but these specimens lack the macro-structural and topographic characteristics of the dental implants used clinical practice. Furthermore, many of these in vitro investigations assessing bacterial adhesion and colonization on implant surfaces have used simple biofilm models, consisting of one or, maximum, two bacterial species, and/or have used short-term evaluations (24 hr or less), thus, lacking the ability to properly study the dynamics of the biofilm maturation and its potential pathogenicity (Pereira et al., 2015; Schmidt et al., 2017; Sridhar et al., 2016).

It was, therefore, the primary purpose of this investigation to describe the process of early biofilm formation over whole dental implants, using a multispecies in vitro biofilm model previously tested on hydroxyapatite, titanium, and zirconium disks (Sanchez et al., 2011, 2014) that includes initial (*Streptococcus oralis* and *Actinomyces*

naeslundii), early (*Veillonella parvula*), secondary (*Fusobacterium nucleatum*), and late colonizers (*Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). The reproducibility of the biofilm and the impact of fixing of the implants to stents were studied as secondary objective, thus, better reproducing the real clinical conditions.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Bacterial strains and culture conditions

Standard strains of *S. oralis* CECT 907T, *V. parvula* NCTC 11810, *A. naeslundii* ATCC 19039, *F. nucleatum* DMSZ 20482, *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 8324, and *P. gingivalis* ATCC 33277 were used. Bacteria were grown on blood agar plates (Blood Agar Oxoid No 2; Oxoid, Basingstoke, UK), supplemented with 5% (v/v) sterile horse blood (Oxoid), 5.0 mg/L hemin (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 1.0 mg/L menadione (Merck, Darmstadt, Germany) in anaerobic conditions (10% H₂, 10% CO₂, and balance N₂) at 37°C for 24–72 hr.

2.2 | Implant material tested

Sterile units of the commercially available, titanium 3i Full OSSEOTITE® Certain® dental implants (Implant Innovations, Inc. 4555 Riverside Drive, Palm Beach Gardens, FL, USA), of 10 mm of length and 3.25/3.4 mm of diameter, with patented sand-blasted and acid-etched surface, were used in the study.

2.3 | Biofilm development

Biofilms were grown on the implant surface, using the protocol previously reported by our research group (Sanchez et al., 2011). In brief, pure cultures of each bacterium were grown anaerobically in a brain-heart infusion (BHI) modified medium, a protein-rich medium containing BHI (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with 2.5 g/L mucin (Oxoid), 1.0 g/L yeast extract (Oxoid), 0.1 g/L cysteine (Sigma), 2.0 g/L sodium bicarbonate (Merck), 5.0 mg/L hemin (Sigma), 1.0 mg/L menadione (Merck), and 0.25% (v/v) glutamic acid (Sigma), during 24–48 hr. After incubation, each mid-exponential phase in the pure bacterial culture was measured by spectrophotometry until developing a bacterial mixture containing 10³ colony-forming units (CFUs)/ml for *S. oralis*, 10³ CFU/ml for *A. naeslundii* and *V. parvula*, and 10⁶ CFU/ml for *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, and *P. gingivalis*.

The sterile implants were placed in the wells of tissue culture plates (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany), and each was inoculated with 1.5 ml of the bacterial mix suspension and then incubated at 37°C in anaerobic conditions to allow bacterial growth (10% H₂, 10% CO₂, and balance N₂) for 12, 24, 48, 72, 96, or 120 hr. Wells containing only culture medium, with or without implants, were also incubated as quality control for unwanted contamination.

2.4 | Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

An Olympus® FV1200 confocal microscope (Olympus Iberia, Barcelona, Spain) was used to evaluate the morphology of fully hydrated biofilms. Before the CLSM analysis, implants were sequentially rinsed three times with 2 ml of sterile phosphate buffer saline (PBS) (immersion time per rinse, 10 s) to remove non-adherent bacteria. The specimens were then stained with LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit solution (Molecular Probes B. V., Leiden, The Netherlands) at room temperature. The 1:1 fluorochrome ratio with a staining time of 9 ± 1 min was used to obtain the optimum fluorescence signal at the corresponding wavelengths (SYTO9®, 515–530 nm; Propidium Iode, >600 nm). The CLSM software was set to take a z-series of scans (xyz) of 1.16 μm thickness (12 bits, $1,024 \times 1,024$ pixel). Image stacks were analyzed with the Imaris 7.7.0® software (Bitplane, Zurich, Switzerland). Three separate and representative surface areas of the implant topography were selected for analysis: (a) the implant thread; (b) the area between threads; and (c) the peak of the implant thread. At least three samples for each incubation time under study were analyzed. Image analysis and live/dead cell ratio (i.e., the area occupied by living cells divided by the area occupied by dead cells) was assessed using the Fiji software (ImageJ version 2.0.0-rc-65/1.52b, open source image processing software). Analyses were carried out at the National Center for Cytometry and Fluorescence Microscopy (Campus of Moncloa, University Complutense, Madrid, Spain). COMSTAT (available as free downloadable software at www.comstat.dk) was used to calculate the biomass in micrometer³/micrometer² ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) of images obtained by CLSM at different incubation times.

2.5 | Scanning electron microscope

Before the Scanning electron microscope (SEM) analysis, implants were sequentially rinsed three times with 2 ml of sterile PBS (immersion time per rinse, 10 s) to remove non-adherent bacteria. After that, the implants were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde (Panreac Quimica, Barcelona, Spain) and 2.5% glutaraldehyde (Panreac Quimica) for 4 hr, at 4°C. These specimens were then washed in PBS and in sterile water (immersion time per washed 10 min) and then dehydrated through a series of graded ethanol solutions (30, 50, 70, 80, 90, and 100%; immersion time per series 10 min). After that, samples were critically point dried, sputter-coated with gold, and analyzed by an electron microscope JSM 6400 (JSM6400, JEOL, Tokyo, Japan), with a back-scattered electron detector and an image resolution of 25 kV. At least three samples for each incubation time under study were analyzed. Analyses were carried out at the ICTS National Center of Electronic Microscopy (International Excellence Campus of Moncloa, University Complutense, Madrid, Spain).

2.6 | DNA isolation and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Before DNA isolation, implants were sequentially rinsed in 2 ml of sterile PBS (immersion time per rinse, 10 s) three times, in order to

remove non-adherent bacteria. Biofilms were then disrupted by vortex at room temperature, during 2 min in 1 ml of sterile PBS, and DNA were isolated using a commercial kit (MoLYsisComplete5; Molzym GmbH & CoKG, Bremen, Germany) following the manufacturer's instructions (protocol for bacterial DNA extraction was followed from step 6, avoiding preliminary steps). The hydrolysis probes 5' nuclease assay PCR method was used for detecting and quantifying bacterial DNA. Primers and probes were provided by Life Technologies Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA), and Roche (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) and were targeted against 16S rRNA gene (Marin, Ambrosio, Herrera, Sanz, & Figuero, 2018; Marin, Figuero, Herrera, & Sanz, 2017). The qPCR amplification was performed in a total reaction mixture volume of 10 μl . The reaction mixtures will be contained 5 μl of 2 \times master mixture (LC 480 Probes Master, Roche), optimal concentrations of primers and probe (900, 900, and 300 nM for *S. oralis*; 300, 300, and 300 nM for *A. naeslundii* and *P. gingivalis*; 750, 750, and 400 nM for *V. parvula*; 300, 300, and 200 nM for *A. actinomycetemcomitans*; and 600, 600, and 300 nM for *F. nucleatum*), and 2 μl of DNA from samples. The negative control was 2 μl of sterile water [non-template control (NTC)] (Water PCR grade, Roche). The samples were subjected to an initial amplification cycle of 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Analyses were performed with a LightCycler® 480 II thermocycler (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). The plates used in the study were FramStar 480 of natural frame and white wells (4titude; The North Barn, Dampthurst Lane, UK), sealed by QPCR Adhesive Clear Seals (4titude).

Each DNA sample was analyzed in duplicate. Quantification cycle (Cq) values were determined using the provided software package (LC 480 software 1.5, Roche). Quantification of cells by qPCR was based on standard curves. The correlation between Cq values and CFU/ml were automatically generated through the software (LC 480 software 1.5, Roche). This protocol was repeated in three independent experiments, each with three replicas containing a whole dental implant, which was incubated for 12, 24, 48, 72, 96, and 120 hr (N = 9 for each incubation time).

2.7 | Biofilm reproducibility

The reproducibility of this biofilm on whole implant surfaces was calculated and compared with biofilms developed on hydroxyapatite, titanium and zirconium disks (Sanchez et al., 2014) using coefficients of variation in regards to the qPCR results (means and standard deviations (SDs) of the CFU/ml of each of the six bacteria used).

2.8 | Biofilm formation over supported implants

Methacrylate cubes, of 10 mm wide and 7 mm high, were fabricated with an internal drilling of 2.7 mm of diameter and 5 mm deep to support the implants in a fixed position allowing the exposure of the coronal third of the implant surface (Figure 1). Implants were screwed in sterilized methacrylate cubes and were incubated with

the same bacteria for 96 hr and analyzed by SEM in the same conditions described above. This protocol was repeated in three independent experiments, each with three replicas containing the dental implants placed in the methacrylate cube ($N = 9$).

2.9 | Statistical analysis

For qPCR analyses, the main outcome variable was the concentration of each bacterium (CFU/ml) at each time point (12, 24, 48, 72, 96, and 120 hr), independently. An experiment-level analysis was performed for each study parameter ($n = 9$), making comparisons among time points. Shapiro–Wilk goodness-of-fit tests and distribution of data were used to assess normality. Data were expressed as means and SD. In order to compare the evolution throughout time for each bacterium, one-way analysis of variance with Bonferroni's correction for multiple comparisons was used. Statistically significant differences were considered for p -values < 0.05 .

A software package (IBM SPSS Statistics 21.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used for all data analysis.

3 | RESULTS

3.1 | CLSM analysis

The bacterial distribution on the different areas of the implant surface was studied at different incubation times by CLSM. Figure 2 shows the presence of bacteria adhered to the implant surface from 12 to 120 hr of growth.

During the first 12 hr, individual bacterial cells and some multicellular aggregates appeared, mostly alive (live/dead cell ratio, 5.14) spread over the whole surface of the implant (Figure 2a). Biomass quantification confirmed this predominance of live bacteria (0.052

$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) against dead bacteria ($0.015 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). At this stage, the area between threads depicted mostly implant surface free of bacteria (color blue in Figure 2a), while the lateral surfaces and the peak of the threads were completely covered with live bacteria (green color in Figure 2a).

After 24 hr of incubation, single cells began to coalesce in microcolonies that spread over the whole implant surface, on the lateral surfaces, on peaks of the implant threads, and on the area between threads (Figure 2b). At this point, live bacteria were still much more prevalent than dead bacteria, with a live/dead cell ratio of 4.37, and a biomass quantification of $0.058 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ for live bacteria against $0.026 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ for dead bacteria.

As the incubation time progressed to 48 hr (Figure 2c), the biofilm structure acquired a more complex morphology and dead bacterial cells (red color in Figure 2c) began to be more evident on the surface of the implant, decreasing the live/dead cell ratio to 2.58. Biomass quantification showed slightly higher numbers of dead bacteria ($0.086 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) than live bacteria ($0.076 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). It is remarkable that dead bacteria were mainly located in area between threads and in lateral surfaces of the thread, while live bacteria were confined to the more external area of the thread, on the peak.

After 72 hr of incubation (Figure 2d), there was a decrease in bacterial biomass confirmed by COMSTAT quantification ($0.017 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ for live bacteria and $0.026 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ for dead bacteria) which, however, increased after 96 hr of incubation, with live bacterial cells again predominating over dead cells (live/dead cell ratio, 2.91)(biomass quantification, $0.044 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ for live bacteria and $0.032 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ for dead bacteria). At this incubation time (96 hr), the bacterial distribution already observed at 48 hr was maintained, with microcolonies over the whole implant surface, with most of dead bacteria located in area between threads and in the lateral surfaces of the threads, and live bacteria predominating on the most external part of the threads (Figure 2e).

At 120 hr, there was a clear decrease in biofilm volume, with a predominance of dead bacteria (biomass quantification $0.020 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) over live ($0.005 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), depicting a live/dead cell ratio of 0.71 (Figure 2f).

3.2 | SEM analysis

Bacteria covered the implant surface surrounded by a light extracellular matrix (Figures 3 and 4). At 12 hr of incubation, spindle-shaped rods and short streptococcal chains were clearly recognized, corresponding to *F. nucleatum* and *S. oralis*, respectively, (Figure 3a,b). As incubation time progressed, from 24 to 120 hr, single cells began to coalesce in microcolonies with increased in thickness. Spindle-shaped rods (*F. nucleatum*) formed complex networks and three-dimensional structures with adhered microcolonies (Figure 3c,d and Figure 4a). When biofilm reached a mature state, the bacterial cell mass within the extracellular matrix covered the surface of the implant with the typical morphology of stacks containing bacterial communities and broad channels in between (Figure 4b,c, green arrows).



FIGURE 1 Image corresponding to the methacrylate stents, of 10 mm wide and 7 mm high and an internal drilling of 2.7 mm of diameter and 5 mm deep to support the implants in a fixed position allowing the exposure of the coronal third of the implant surface

FIGURE 2 Images obtained by confocal laser scanning microscopy (CLSM, 20×) at 12 (a), 24 (b), 48 (c), 72 (d), 96 (e), and 120 (f) h of incubation of biofilm over whole dental implants, using LIVE/DEAD® BacLight Kit. It is possible to differentiate live bacteria (in green), dead bacteria (in red), and implant surface (in blue). Biofilm presence was detected from 12 hr (a; scale bar = 100 μ m) to 120 hr (f; scale bar = 70 μ m). Bacteria can be appreciated spread over the whole surface of the implant, both in the lateral surfaces and peaks of the implant threads, as in the area between threads. At 24 hr (b; scale bar = 70 μ m), bacterial cells start to cluster. At 48 hr (c; scale bar = 80 μ m), dead bacteria increase (red color) in areas between threads. Presence of bacteria (live and dead) decrease at 72 hr (d; scale bar = 80 μ m), to increase again at 96 hr (e; scale bar = 80 μ m). At 120 hr (f), biofilms are similar to those of 72 hr, with less bacterial presence and a predominance of dead over live bacteria

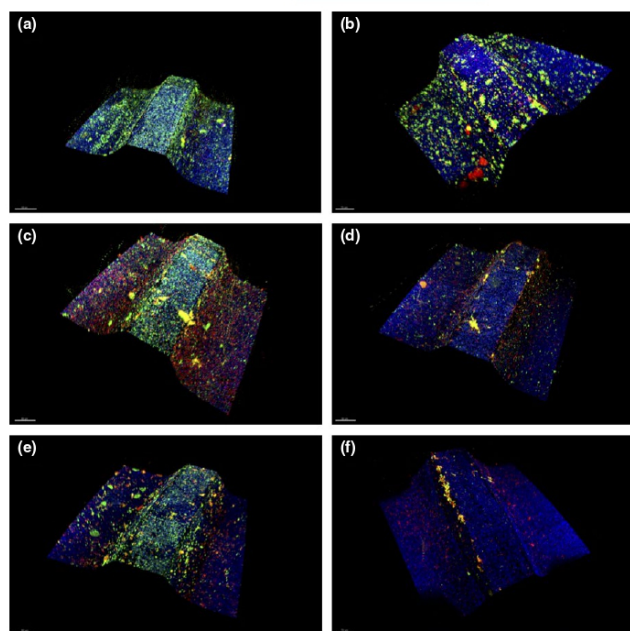
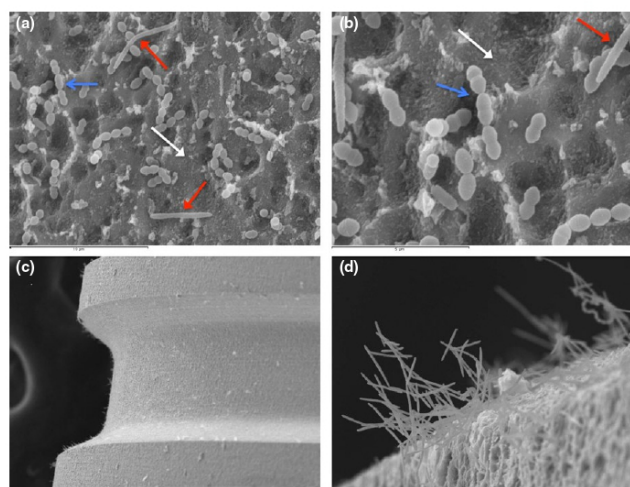


FIGURE 3 Images obtained by scanning electron microscope (SEM) of biofilms developed from 12 hr to 24 hr over whole dental implants. Images a (120×; scale bar 10 μ m) and b (2500×; scale bar 5 μ m) showed biofilms after 12 hr of incubation, perceive both, spindle-shaped rods (red arrows), suggestive of *F. nucleatum*, and cells arranged either as short streptococcal chains over the surface (blue arrows) as well as a light polysaccharide film surrounding bacterial cells (white arrows). Image c corresponds to 24 hr biofilm, showed the implant outline with a soft mantle of bacteria covering it (5000×; scale bar 400 μ m). Also, at 24 hr, *Fusobacterium nucleatum* could be identified forming three-dimensional structures (d; 10000×; scale bar 20 μ m)



3.3 | Quantitative analysis by qPCR

At 12 hr of incubation, the six bacterial species included in the model were detected on the implant surface. Table 1 and Appendix 1 depict the counts, expressed as CFU/ml, of each

bacterial species according to the different incubation times. Figure 5 depicts the dynamics of incorporation of the different bacterial cells to the implant surface, and the significant differences in numbers for each bacterial species depending on the different incubation times.

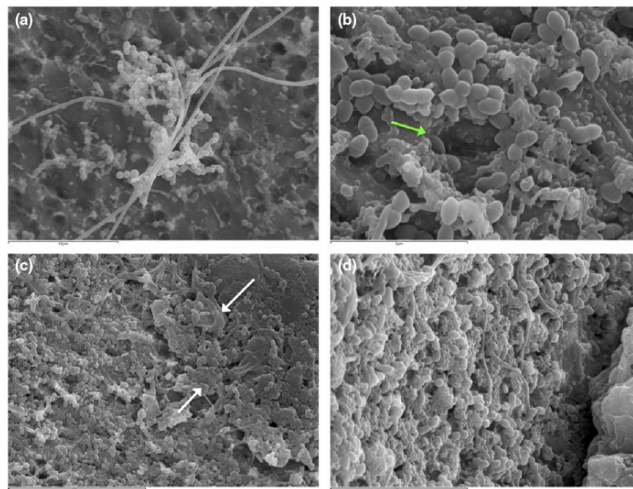


FIGURE 4 Scanning electron microscope (SEM) images showed biofilms growth from 48 hr to 120 hr over whole dental implants. Image a showed biofilms after 48 hr of incubation, with a complex morphology, in which *Fusobacterium nucleatum* formed networks with the adhered microcolonies of bacteria (1000 \times) (scale bar = 10 μ m). In image b (4000 \times) (scale bar = 5 μ m) and image c (5000 \times) (scale bar 20 μ m), at 72 and 96 hr respectively, bacteria are observed in the expected larger stacks (growing masses of bacterial cells) and presence of broad channels (green arrow). It can be observed the cell mass and an extracellular matrix surrounding bacteria in the biofilm (white arrows). From 72 to 120 hr, the biofilm did not change in architecture as shown in image d (10000 \times) (scale bar 10 μ m)

Among the early colonizers, *S. oralis* was present on the implant surface at 12 hr, gradually increasing in density up to 120 hr, reaching highest numbers at 96 hr [1.4×10^7 CFU/ml (SD = 1.4×10^7)]. *Actinomyces naeslundii* significantly increased from 12 to 48 hr ($p = 0.035$) [1.1×10^6 CFU/ml (SD = 9.3×10^5)], then decreasing up to 120 hr. The early colonizer *V. parvula* also rise significantly in numbers until 96 hr [1.2×10^7 CFU/ml (SD = 1.1×10^7)] then it remained stable up to 120 hr (Figure 5). *Fusobacterium nucleatum* was already present at high numbers on the implant surface at 12 hr, reaching the maximum density at 96 hr [1.0×10^7 CFU/ml (SD = 8.4×10^6)], then remaining stable throughout the rest of the incubation process (Figure 5). The late colonizers were also detected in the biofilm at 12 hr, with *P. gingivalis* increasing from 12 to 96 hr, when its density peaked [1.9×10^7 CFU/ml (SD = 1.1×10^7)] (Figure 5). *A. actinomycetemcomitans* was present in the biofilm after 12 hr, in relatively high numbers, then maintaining its numbers, with two peaks of higher densities at 24 and 96 hr of incubation [8.1×10^7 CFU/ml (SD = 7.6×10^7) and 6.1×10^7 CFU/ml (SD = 3.2×10^7)], respectively (Figure 5).

3.4 | Reproducibility

Table 2 depicts the results of the reproducibility study comparing these results with those obtained when developing the same multispecies biofilms on disks using a well-validated model (Sanchez et al., 2014). Even though the coefficients of variation were high, the percentages were similar, although higher percentages were detected for *V. parvula* and *A. naeslundii* and lower for *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*.

3.5 | Biofilm formation over supported implants

After 96 hr of incubation, when implants were fixed in the methacrylate cubes, the bacterial cell mass within the extracellular matrix

grew over the exposed implant surface (Figure 6a). At the more external part of the thread (Figure 6c), the cell mass was extremely dense, and distinct bacterial morphologies were identified, such as cocci (*S. oralis*) and spindle-shaped rods (*F. nucleatum*). In the area between threads, bacterial cells formed communities intimately associated with *F. nucleatum* and surrounded by a dense extracellular matrix (Figure 6d). Compared to the more external part of the thread, the microcolonies were more scattered on the surface.

Although bacterial cells were able to colonize the implant area anchored in the device (Figure 6b), the developed biofilm were thinner showing scattered bacterial colonies, adhered to spindle-shaped rods (*F. nucleatum*) surrounded by a thin extracellular matrix (Figure 6e,f).

4 | DISCUSSION

The possible influence of the implant macrostructure on biofilm formation was studied using an in vitro model that allows the evaluation of the dynamics of biofilm formation and maturation on the whole implant surface using BHI modified growth medium. This medium is one of the key factors in in vitro biofilm development, because it strongly influences intra- and interspecies aggregation and co-aggregation. It is a complex medium with a high proportion of proteins, reproducing the carbon and energy sources available to bacteria within the oral cavity (Sanchez et al., 2011). The results have shown that the complete implant surface was colonized in a short period of time by the different bacterial species used and with time, and it evolves to a mature, discontinuous, and well-structured biofilm. Depending on the location, this biofilm exhibited different ratios of viability, with the peaks of the threads harboring more live bacteria and the valleys between threads, more dead bacteria.

TABLE 1 Numbers (expressed as mean and standard deviation (SD) and 95% confidence intervals for means) of bacterial species [colony-forming units (CFUs)/ml] determined by quantitative Polymerase chain reaction (qPCR) in 12 to 120 hr biofilms on whole titanium dental implants ($n = 9$), using specific primers and probes directed to the 16S rRNA gene

Bacterial species	Incubation time (hours)	Bacterial densities (CFU/ml)		
		Mean (SD)	95% Confidence interval for mean	
			Lower limit	Upper limit
<i>Streptococcus oralis</i>	12	5.2×10^6 (4.7×10^6)	1.5×10^6	8.8×10^6
	24	6.5×10^6 (3.4×10^6)	3.8×10^6	9.1×10^6
	48	1.3×10^7 (1.2×10^7)	3.8×10^6	2.3×10^7
	72	1.0×10^7 (8.4×10^6)	3.7×10^6	1.7×10^7
	96	1.4×10^7 (1.4×10^7)	3.9×10^6	2.5×10^7
	120	5.4×10^6 (5.3×10^6)	1.3×10^6	9.5×10^6
<i>Veillonella parvula</i>	12	9.4×10^4 (8.0×10^4)	3.3×10^4	1.5×10^5
	24	3.3×10^6 (1.1×10^6)	2.4×10^6	4.1×10^6
	48	4.4×10^6 (2.6×10^6)	2.5×10^6	6.4×10^6
	72	3.9×10^6 (2.1×10^6)	1.7×10^6	4.9×10^6
	96	1.2×10^7 (1.1×10^7)	3.8×10^6	2.1×10^7
	120	7.8×10^6 (2.6×10^6)	5.8×10^6	9.8×10^6
<i>Actinomyces naeslundii</i>	12	3.2×10^5 (1.8×10^5)	1.8×10^5	4.7×10^5
	24	3.6×10^5 (3.3×10^5)	1.1×10^5	6.1×10^5
	48	1.1×10^6 (9.3×10^5)	4.3×10^5	1.9×10^6
	72	3.1×10^5 (2.0×10^5)	1.5×10^5	4.7×10^5
	96	7.0×10^5 (6.5×10^5)	2.0×10^5	1.2×10^6
	120	9.0×10^5 (5.4×10^5)	4.9×10^5	1.3×10^6
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	12	6.8×10^6 (4.2×10^6)	3.5×10^6	1.0×10^7
	24	7.0×10^6 (5.0×10^6)	3.1×10^6	1.1×10^7
	48	3.0×10^6 (2.0×10^6)	1.4×10^6	4.5×10^6
	72	3.2×10^6 (2.1×10^6)	1.6×10^6	4.8×10^6
	96	1.0×10^7 (8.4×10^6)	3.8×10^6	1.7×10^7
	120	9.7×10^6 (1.0×10^7)	1.6×10^6	1.8×10^7
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	12	2.2×10^5 (8.4×10^4)	1.5×10^5	2.8×10^5
	24	2.4×10^5 (8.9×10^4)	1.7×10^5	3.1×10^5
	48	3.0×10^5 (3.5×10^5)	2.6×10^4	5.7×10^5
	72	2.3×10^6 (2.3×10^6)	5.3×10^5	4.1×10^6
	96	2.0×10^7 (1.1×10^7)	1.1×10^7	2.8×10^7
	120	7.6×10^6 (5.5×10^6)	3.4×10^6	1.2×10^7
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	12	2.9×10^7 (1.6×10^7)	1.6×10^7	4.2×10^7
	24	8.1×10^7 (7.6×10^7)	2.8×10^7	1.4×10^8
	48	2.8×10^7 (1.2×10^7)	1.9×10^7	3.8×10^7
	72	1.5×10^7 (1.3×10^7)	5.1×10^6	2.5×10^7
	96	6.1×10^7 (3.2×10^7)	3.6×10^7	8.6×10^7
	120	5.5×10^7 (3.6×10^7)	2.7×10^7	8.3×10^7

The morphological study using CLSM and SEM has demonstrated that early biofilms did not cover uniformly the total implant surface, with scattered bacterial cells adhered to the whole implant surface as multicellular aggregates (areas between threads, lateral surfaces of the thread and peaks). As the biofilm matured, it grew in volume and acquired the typical biofilm morphology

depicting stacks of bacterial communities with interspersed channels. It was noticeable that the area between threads accumulated higher amounts of dead bacteria, which possibly reflects the lesser availability of nutrients in the lesser accessible area, although the high fluctuations in the proportion of live/dead bacteria at the different incubation times probably reflected the ability of bacteria

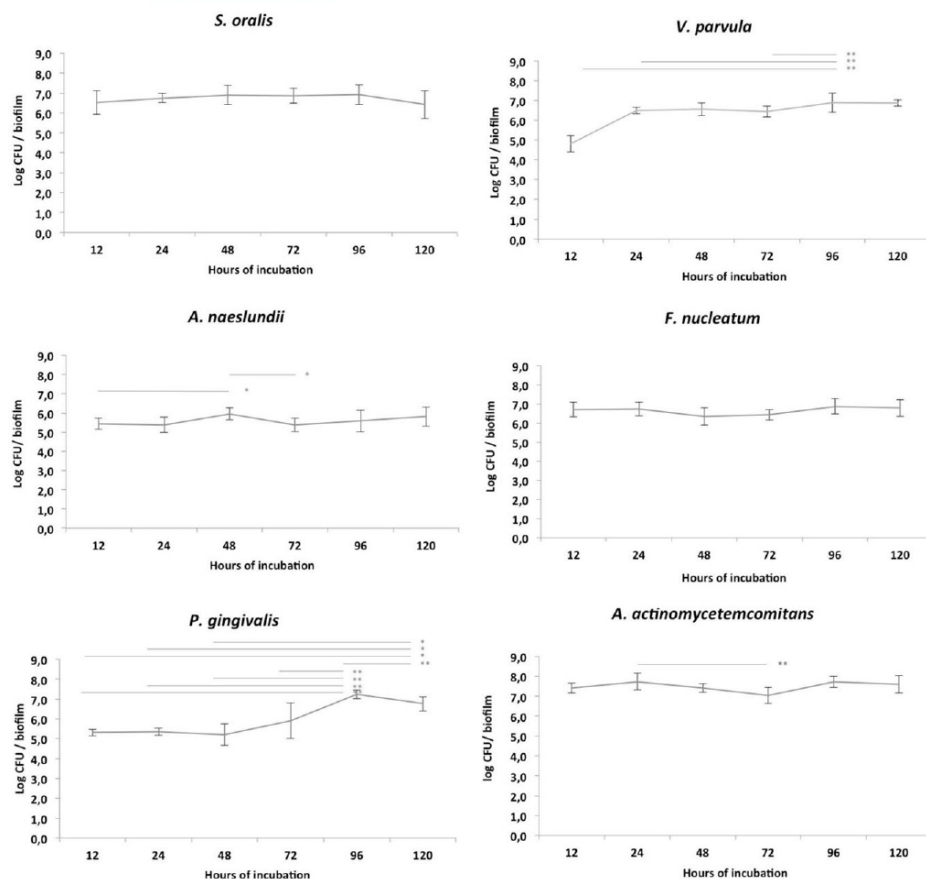


FIGURE 5 Kinetics of incorporation of the six bacterial species in the biofilm [log of colony forming units (CFUs)/ml] on whole dental implants, obtained by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) from biofilms of 12 to 120 hr of incubation, using specific primers and probes directed to the 16S rRNA gene. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

to obtain nutrition from the dead bacterial cells. With qPCR, the highest numbers of total bacteria were found after 96 hr of incubation, with most of the live bacteria present on the peak of the threads and the dead bacteria confined to the deepest part of the area between threads. At this time (96 hr), this biofilm showed high reproducibility, in comparison with the previously published biofilm model developed on titanium, zirconium, or hydroxyapatite disks (Sanchez et al., 2014) (Table 2), although the high values in the variation coefficients could be explained by the complexity of a living bacterial biofilm (Sanchez et al., 2011; Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, & Kent, 1998).

The comparison of this biofilm with previously published investigations evaluating biofilm formation on implant surfaces is

difficult since these studies have used different samples such as disks, squares, nanotubes, etc, but not whole implant surfaces depicting the typical macro-structural design characteristics of threads, picks, and valleys (B. Guggenheim, Giertsen, Schubach, & Shapiro, 2001; Lin et al., 2013; Narendrakumar et al., 2015; Park, Lee, Um, Chang, & Lee, 2014; Rath, Stumpp, & Stiesch, 2017; Roehling et al., 2017; Sanchez et al., 2014; Schmidlin et al., 2013; Thurnheer & Belibasakis, 2016; Violant et al., 2014). Similarly to the morphology shown on titanium and zirconium disks using the same multispecies bacterial inoculum (Sanchez et al., 2014), the resulting biofilms formed a continuous dense mass, covering the entire surface of the implant surface. Moreover, the morphological study of both in vivo and in vitro biofilm formation on two different

TABLE 2 Coefficient of variation (CV) values obtained for whole dental implants (WDIs) ($n = 18$) and hydroxyapatite disks (HA) ($n = 3$), titanium disks (Ti) ($n = 3$), zirconium disks (Zn) ($n = 3$) (Sanchez et al., 2014) for each bacteria employed in the model

Bacterial species	Material device	CV (%)
<i>Streptococcus oralis</i>	HA	82.1
	Ti	36.5
	Zn	44.9
	WDI	71.1
<i>Veillonella parvula</i>	HA	145.9
	Ti	92.9
	Zn	83.9
	WDI	156.3
<i>Actinomyces naeslundii</i>	HA	158.3
	Ti	66.8
	Zn	81.6
	WDI	152.4
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	HA	151.2
	Ti	75.7
	Zn	86.3
	WDI	90.9
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	HA	36.3
	Ti	43.6
	Zn	57.7
	WDI	65.5
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	HA	1.9
	Ti	99.1
	Zn	37.3
	WDI	63.1

titanium implant surfaces (Burgers et al., 2010) also reported a similar continuous and homogeneous layer covering the entire surface of the titanium disks.

With the use of SEM, the three-dimensional morphology of the biofilm could be assessed. As the biofilm matured, the microbial communities formed stacks, covered with extracellular matrix with interspersed broad channels. In some cases (Figure 4b,c), it could be observed that the extracellular matrix appeared weak and at distance from the bacterial cells, what could be due to the processing for SEM electron microscopy. The treatment of the samples during the processing included dehydration steps through a series of graded ethanol solutions, what may affect the composition and thickness of the EPS, since water is one of its major constituents. In previous investigations by our research group using the low temperature-SEM technique and the same in vitro biofilm model, the biofilm structure and the relationship between the bacterial cells and the extracellular polysaccharide matrix were not affected (Sanchez et al., 2014). These discrepancies, hence, may be explained by the use of ambient temperature SEM, with inferior specimen preservation, when compared to LT-SEM, since in this latter technique, frozen-hydrated samples retain most of their

water, are rapidly immobilized and stabilized by cryofixation, and are not exposed to chemical modification or solvent extraction.

This arrangement of the biofilm on the surface of the implant observed by SEM has been confirmed by the CLSM technique, where the colonies appear along the whole implant surface as multicellular aggregates. A similar structure has been described by other authors studying biofilm formation on different implant surfaces (Sanchez et al., 2014). These studies reported a thick layer of biofilm covering the whole surface of titanium disks with stacks and channels but without being able to identify the different bacterial microcolonies shown in the present study. These results suggest that the biofilm morphology may depend more on the implant micro surface characteristics than on the macrostructure of the implant.

The dynamics of biofilm formation were studied using qPCR demonstrating that the six tested bacterial species were already incorporated into the biofilm after 12 hr, what has been previously reported in both in vitro and in vivo investigations (Burgers et al., 2010). Schmidlin et al. (Schmidlin et al., 2013) using a multispecies biofilm model observed initial microbial adherence on titanium surfaces already after 20 min of incubation. Similarly, Guggenheim et al. (M. Guggenheim, Shapiro, Gmur, & Guggenheim, 2001), using an in vitro oral biofilm model composed by *A. naeslundii*, *Veillonella dispar*, *F. nucleatum*, *Streptococcus sobrinus*, and *S. oralis* strains, detected all these species in the biofilm after 15 min of inoculation. The present study has shown that the secondary (*F. nucleatum*) and late colonizers (*A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*) were already present after 12 hr at high densities. This is in line with results obtained in in vivo studies (Furst, Salvi, Lang, & Persson, 2007) which have reported that the colonization of the implant's surface by microbial species starts already 30 min after implant placement, and the bacteria load stays the same for the first week. After that, the bacterial load starts to increase significantly among the time, and at 12 months, the bacterial load appears to be significantly higher compared with the moment of implantation (Salvi, Furst, Lang, & Persson, 2008).

Few studies have used whole dental implants to study their microbial colonization. Schmidt et al. (Schmidt et al., 2017) used whole implants to study the in vitro efficacy different mechanical debridement modalities in biofilm formation at the implant neck. The in vitro adhesion of commensal and pathogenic bacteria to commercial titanium implants with different surfaces has been studied in different studies, however, the measured bacterial species were tested independently, as a monospecies biofilm (Di Giulio et al., 2016; Narendrakumar et al., 2015).

A methacrylate stent for allowing the anchorage of the implants and only exposing the coronal third of the implant was used with the purpose to simulate the in vivo conditions in the oral cavity where exposed implant surfaces of the implant are the ones colonized by bacteria (Schwarz et al., 2007; Valente & Andreana, 2016; Zhang, Geraets, Zhou, Wu, & Wismeijer, 2014). With this design, the exposed implant micro- and macro-surface topography developed a mature biofilm with morphological and dynamic characteristics similar to mature in vivo biofilms.

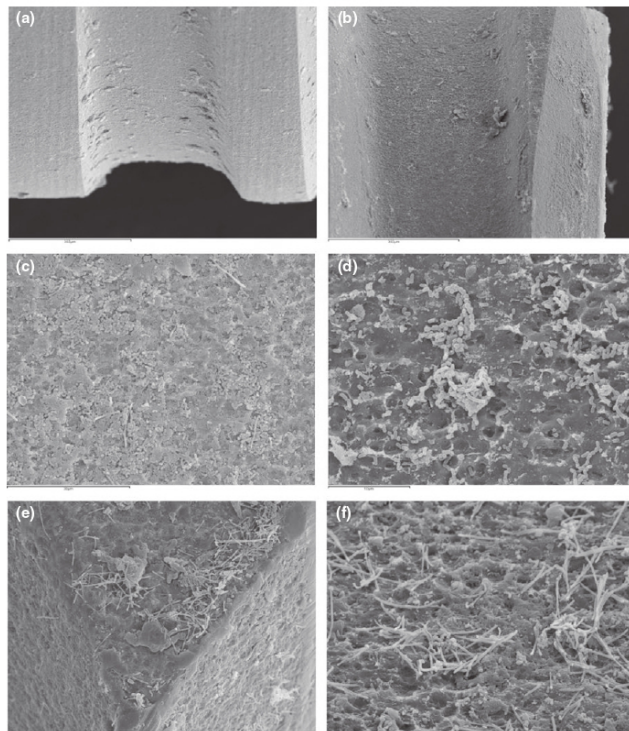


FIGURE 6 Scanning electron microscope (SEM) images showed biofilms growth for 96 hr of incubation over implants fixed in the methacrylate cubes. Image a (150×) (scale bar 300 μm) showed the bacterial cell mass within the extracellular matrix grew over the exposed implant surface. Image c (1500×) (scale bar 30 μm) showed the more external part of the thread with a cell mass extremely dense. Image d (3000×) (scale bar 10 μm) corresponds to the area between threads with bacterial microcolonies surrounded by a dense extracellular matrix more scattered on the surface when compared to the more external part of the thread. Although bacterial cells were able to colonize the implant area anchored in the device as shown in image b (160×) (scale bar 300 μm), the developed biofilm were thinner showing scattered bacterial colonies [Images e (1200×) (scale bar 40 μm) and f (2000×) (scale bar 20 μm)]

However, this study has clear limitations due to its in vitro design, mainly derived from the differences in the microenvironment with the oral cavity (lack of crevicular fluid, host response, etc.) and the limited selection of only six representative bacteria, compared with the heterogeneity of the oral microbiome (Saeidnia, Manayi, & Abdollahi, 2015). Although in vivo biofilm development on enamel chips or disks may share similarities with the patient's dental plaque, this in vitro biofilm model has used a defined consortium of bacterial species, which may be valid and highly reproducible for these bacterial communities, but may be different to others, considering the heterogeneity of the oral microbiome (Ammann, Bostanci, Belibasakis, & Thurnheer, 2013; B. Guggenheim, Shapiro, Gmur, & Guggenheim, 2001; Sanchez et al., 2011). The bacterial species selected in this study have been previously used in a biofilm model over hydroxyapatite, titanium, and zirconium disks (Sanchez et al., 2017, 2014). Sanz-Martin et al. (Sanz-Martin et al., 2017) in the study of the microbiome of healthy and diseased peri-implant sites, using Illumina sequencing, found that, while the healthy core was rich in health-compatible bacteria, as *Streptococcus* spp. and *V. parvula*, the peri-implantitis core was rich in pathogenic taxa as *P. gingivalis*. Also, authors observed that the peri-implant microbiome core contained members of genera *Fusobacterium* among others, which is known to be associated with periodontal inflammation. Maruyama et al. (Maruyama et al., 2014) shown in

their results that *P. gingivalis* was abundant and prevalent in most samples of peri-implantitis. Presence of *A. actinomycetemcomitans* is also supported by studies that found high levels of this bacteria in several peri-implantitis cases (Leonhardt, Dahlen, & Renvert, 2003). Therefore, it is important to keep in mind that most of our knowledge on biofilm formation on implant surfaces is based on in vitro investigations, since they involved cheap and simple methods which do not require patient compliance and ethical considerations (Roberts, Kragh, Bjarnsholt, & Diggle, 2015).

In conclusion, and considering the limitations of this in vitro investigation, it might be concluded that (a) dental implants can be colonized by different bacterial species in a short period of time, developing into a mature and well structure biofilm; (b) the cellular viability of the formed biofilms differed depending on their location on the macrostructure of the implant, being the peak of the threads the area harboring more live bacteria, and the valleys between the threads collecting more dead bacteria, which may behave as a nutritional reservoir for further bacterial colonization; and (c) although the structure (stacks, extracellular matrix and broad channels) reached by the biofilm does not differ depending on the specimen tested (whole implants, disks, etc.), the surface disposition differed, which indicated that the biofilm mass may be affected by the macrostructure of the implant.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the technical support of Dr. A.M. Vicente, at the ICTS National Centre of Electron Microscopy (University Complutense, Madrid, Spain), and A. Cortés and Dr. C. Pérez, at the Center of Microscopy and Cytometry (University Complutense, Madrid, Spain).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interests with this research.

AUTHOR CONTRIBUTION

PB: Data collection, data interpretation, and drafting article; MCS: Concept, design, data interpretation, and critical revision of article; AL-P: Concept and critical revision of article; EF: Statistics, approval article, and critical revision of article; DH, MS: Concept, design, and approval of article and critical revision of article.

ORCID

Patricia Bermejo  <https://orcid.org/0000-0003-4122-4273>

Arancha Llana-Palacios  <https://orcid.org/0000-0001-6486-0120>

David Herrera  <https://orcid.org/0000-0002-5554-2777>

Mariano Sanz  <https://orcid.org/0000-0002-6293-5755>

REFERENCES

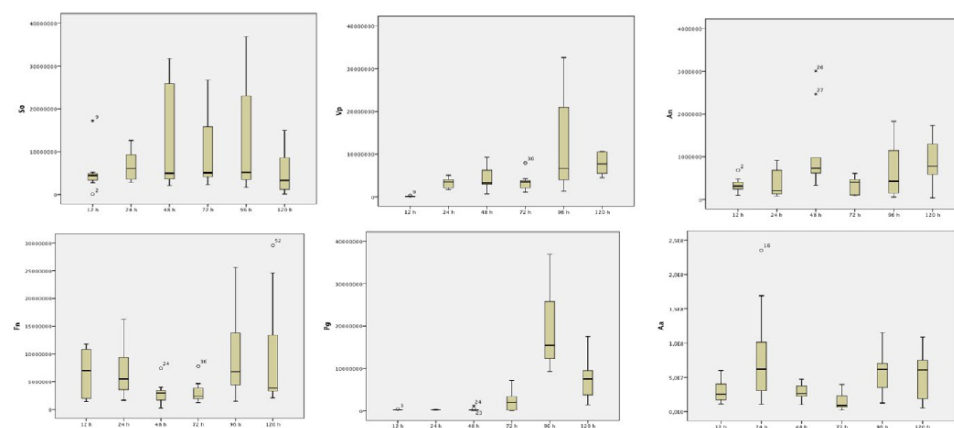
- Aguiar, S., Donos, N., Spratt, D., & Bozec, L. (2015). Nanoadhesion of *Staphylococcus aureus* onto titanium implant surfaces. *Journal of Dental Research*, 94(8), 1078–1084. <https://doi.org/10.1177/0022034515591485>
- Al-Ahmad, A., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Faust, J., Bachle, M., Follo, M., Wolkewitz, M., ... Kohal, R. (2010). Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 95(1), 101–109. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31688>
- Ammann, T. W., Bostanci, N., Belibasakis, G. N., & Thurnheer, T. (2013). Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research*, 48(4), 517–526. <https://doi.org/10.1111/jre.12034>
- Burgers, R., Gerlach, T., Hahnel, S., Schwarz, F., Handel, G., & Gosau, M. (2010). In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 21(2), 156–164. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01815.x>
- Busscher, H. J., Rinastiti, M., Siswomihardjo, W., & van der Mei, H. C. (2010). Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *Journal of Dental Research*, 89(7), 657–665. <https://doi.org/10.1177/0022034510368644>
- Cordeiro, J. M., & Barao, V. A. (2017). Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Materials Science and Engineering C, Materials for Biological Applications*, 71, 1201–1215. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.025>
- de Avila, E. D., Lima, B. P., Sekiya, T., Torii, Y., Ogawa, T., Shi, W., & Lux, R. (2015). Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium implant material. *Biomaterials*, 67, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.030>
- Di Giulio, M., Traini, T., Sinjari, B., Nostro, A., Caputi, S., & Cellini, L. (2016). *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation in different titanium surfaces, an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research*, 27(7), 918–925. <https://doi.org/10.1111/clr.12659>
- Ferreira Ribeiro, C., Cogo-Muller, K., Franco, G. C., Silva-Concilio, L. R., Sampaio Campos, M., de Mello Rode, S., & Claro Neves, A. C. (2016). Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Archives of Oral Biology*, 69, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.05.006>
- Filoché, S., Wong, L., & Sissons, C. H. (2010). Oral biofilms: Emerging concepts in microbial ecology. *Journal of Dental Research*, 89(1), 8–18. <https://doi.org/10.1177/0022034509351812>
- Furst, M. M., Salvi, G. E., Lang, N. P., & Persson, G. R. (2007). Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*, 18(4), 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01381.x>
- Guggenheim, B., Giertsen, E., Schupbach, P., & Shapiro, S. (2001). Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *Journal of Dental Research*, 80(1), 363–370. <https://doi.org/10.1177/00220345010800011201>
- Guggenheim, M., Shapiro, S., Gmur, R., & Guggenheim, B. (2001). Spatial arrangements and associative behavior of species in an in vitro oral biofilm model. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1343–1350. <https://doi.org/10.1128/aem.67.3.1343-1350.2001>
- Jung, R. E., Zembic, A., Pjetursson, B. E., Zwahlen, M., & Thoma, D. S. (2012). Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. *Clinical Oral Implants Research*, 23(Suppl 6), 2–21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02547.x>
- Leonhardt, A., Dahlen, G., & Renvert, S. (2003). Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. *Journal of Periodontology*, 74(10), 1415–1422. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.10.1415>
- Lin, H. Y., Liu, Y., Wismeijer, D., Crielaard, W., & Deng, D. M. (2013). Effects of oral implant surface roughness on bacterial biofilm formation and treatment efficacy. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 28(5), 1226–1231. <https://doi.org/10.11607/jomi.3099>
- Long, M., & Rack, H. J. (1998). Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials*, 19(18), 1621–1639. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00146-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00146-4)
- Marin, M. J., Ambrosio, N., Herrera, D., Sanz, M., & Figuero, E. (2018). Validation of a multiplex qPCR assay for the identification and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: In vitro and subgingival plaque samples. *Archives of Oral Biology*, 88, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.01.012>
- Marin, M. J., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). Quantitative analysis of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction (PCR). *Methods in Molecular Biology*, 1537, 191–202. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6685-1_11
- Maruyama, N., Maruyama, F., Takeuchi, Y., Aikawa, C., Izumi, Y., & Nakagawa, I. (2014). Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. *Scientific Reports*, 4, 6602. <https://doi.org/10.1038/srep06602>
- Narendrakumar, K., Kulkarni, M., Addison, O., Mazare, A., Junkar, I., Schukli, P., ... Iglic, A. (2015). Adherence of oral streptococci to nanostructured titanium surfaces. *Dental Materials*, 31(12), 1460–1468. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.09.011>

- Papavasileiou, D., Behr, M., Gosau, M., Gerlach, T., & Buegers, R. (2015). Peri-implant biofilm formation on luting agents used for cementing implant-supported fixed restorations: a preliminary in vivo study. *The International Journal of Prosthodontics*, 28(4), 371–373. <https://doi.org/10.11607/ijp.4100>
- Park, J. H., Lee, J. K., Um, H. S., Chang, B. S., & Lee, S. Y. (2014). A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 44(2), 79–84. <https://doi.org/10.5051/jpis.2014.44.2.79>
- Pereira, J., Tavares, F., Lima, K., Carreiro, A., Henriques, B., Silva, F., ... Souza, J. (2015). Relation between dental implant joint surfaces and biofilm formation. *Dentistry*, 5(5), 296. <https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000296>
- Pita, P. P., Rodrigues, J. A., Ota-Tsuzuki, C., Miato, T. F., Zenobio, E. G., Giro, G., ... Shibibi, J. A. (2015). Oral streptococci biofilm formation on different implant surface topographies. *BioMed Research International*, 2015, 159625. <https://doi.org/10.1155/2015/159625>
- Quirynen, M., De Soete, M., & van Steenberghe, D. (2002). Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical Oral Implants Research*, 13(1), 1–19. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130101.x>
- Quirynen, M., Al-Nawas, B., Meijer, H. J., Razavi, A., Reichert, T. E., Schimmel, M., ... Romeo, E. (2015). Small-diameter titanium Grade IV and titanium-zirconium implants in edentulous mandibles: three-year results from a double-blind, randomized controlled trial. *Clinical Oral Implants Research*, 26(7), 831–840. <https://doi.org/10.1111/clr.12367>
- Rath, H., Stumpp, S. N., & Stiesch, M. (2017). Development of a flow chamber system for the reproducible in vitro analysis of biofilm formation on implant materials. *PLoS ONE*, 12(2), e0172095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172095>
- Ready, D., Theodoridis, G., Green, I., Ciric, L., Pratten, J., Tay, W., & McDonald, A. (2015). In vitro evaluation of the antibiofilm properties of chlorhexidine and delmopinol on dental implant surfaces. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 662–666. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.01.020>
- Roehling, S., Astasov-Frauenhoffer, M., Hauser-Gerspach, I., Brissant, O., Woelfler, H., Walimo, T., ... Gahlert, M. (2017). In vitro biofilm formation on titanium and zirconia implant surfaces. *Journal of Periodontology*, 88(3), 298–307. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160245>
- Roos-Jansaker, A. M., Lindahl, C., Renvert, H., & Renvert, S. (2006). Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part I: implant loss and associations to various factors. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(4), 283–289. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00907.x>
- Saeidnia, S., Manayi, A., & Abdollahi, M. (2015). From in vitro experiments to in vivo and clinical studies: pros and cons. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(4), 218–224.
- Salvi, G. E., Furst, M. M., Lang, N. P., & Persson, G. R. (2008). One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clinical Oral Implants Research*, 19(3), 242–248. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01470.x>
- Sanchez, M. C., Fernandez, E., Llama-Palacios, A., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. *Dental Materials*, 33(4), 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.01.013>
- Sanchez, M. C., Llama-Palacios, A., Blanc, V., Leon, R., Herrera, D., & Sanz, M. (2011). Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research*, 46(2), 252–260. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01341.x>
- Sanchez, M. C., Llama-Palacios, A., Fernandez, E., Figuero, E., Marin, M. J., Leon, R., ... Sanz, M. (2014). An in vitro biofilm model associated to dental implants: structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dental Materials*, 30(10), 1161–1171. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.07.008>
- Sanz-Martin, I., Doolittle-Hall, J., Teles, R. P., Patel, M., Belibasakis, G. N., Hammerle, C. H. F., ... Teles, F. R. F. (2017). Exploring the microbiome of healthy and diseased peri-implant sites using Illumina sequencing. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(12), 1274–1284. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12788>
- Schmidlin, P. R., Muller, P., Attin, T., Wieland, M., Hofer, D., & Guggenheim, B. (2013). Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *Journal of Applied Oral Science*, 21(1), 48–55. <https://doi.org/10.1590/1678-7757201302312>
- Schmidt, K. E., Auschill, T. M., Heumann, C., Frankenberger, R., Eick, S., Sculean, A., & Arweiler, N. B. (2017). Influence of different instrumentation modalities on the surface characteristics and biofilm formation on dental implant neck, in vitro. *Clinical Oral Implants Research*, 28(4), 483–490. <https://doi.org/10.1111/clr.12823>
- Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Bieling, K., Sculean, A., & Becker, J. (2007). Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 18(2), 161–170. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01320.x>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. Jr (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>
- Song, F., Koo, H., & Ren, D. (2015). Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *Journal of Dental Research*, 94(8), 1027–1034. <https://doi.org/10.1177/0022034515587690>
- Sridhar, S., Abidi, Z., Wilson, T. G. Jr, Valderrama, P., Wadhvani, C., Palmer, K., & Rodrigues, D. C. (2016). In vitro evaluation of the effects of multiple oral factors on dental implants surfaces. *Journal of Oral Implantology*, 42(3), 248–257. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-15-00165>
- Thurnheer, T., & Belibasakis, G. N. (2016). Incorporation of staphylococci into titanium-grown biofilms: an in vitro "submucosal" biofilm model for peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 27(7), 890–895. <https://doi.org/10.1111/clr.12715>
- Valente, N. A., & Andreana, S. (2016). Peri-implant disease: What we know and what we need to know. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 46(3), 136–151. <https://doi.org/10.5051/jpis.2016.46.3.136>
- Violant, D., Galofre, M., Nart, J., & Teles, R. P. (2014). In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm on different implant surfaces. *Biomedical Materials*, 9(3), 035007. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/3/035007>
- Xing, R., Lyngstadaas, S. P., Ellingsen, J. E., Taxt-Lamolle, S., & Haugen, H. J. (2015). The influence of surface nanoroughness, texture and chemistry of TiZr implant abutment on oral biofilm accumulation. *Clinical Oral Implants Research*, 26(6), 649–656. <https://doi.org/10.1111/clr.12354>
- Yeo, I. S., Kim, H. Y., Lim, K. S., & Han, J. S. (2012). Implant surface factors and bacterial adhesion: A review of the literature. *The International Journal of Artificial Organs*, 35(10), 762–772. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000154>
- Zhang, L., Geraets, W., Zhou, Y., Wu, W., & Wismeijer, D. (2014). A new classification of peri-implant bone morphology: A radiographic study of patients with lower implant-supported mandibular overdentures. *Clinical Oral Implants Research*, 25(8), 905–909. <https://doi.org/10.1111/clr.12193>

How to cite this article: Bermejo P, Sánchez MC, Llama-Palacios A, Figuero E, Herrera D, Sanz M. Topographic characterization of multispecies biofilms growing on dental implant surfaces: An in vitro model. *Clin Oral Impl Res*. 2019;30:229–241. <https://doi.org/10.1111/clr.13409>

APPENDIX 1

Box-plot of each bacterial species determined by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) in 12 to 120 hr biofilms on whole titanium dental implants (n = 9), using specific primers and probes directed to the 16S rRNA gene. So, *Streptococcus oralis*; Vp, *Veillonella parvula*; An, *Actinomyces naeslundii*; Aa, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Fn, *Fusobacterium nucleatum*; Pg, *Porphyromonas gingivalis*.



Artículo 2



Received: 19 March 2019 | Revised: 2 May 2019 | Accepted: 5 May 2019

DOI: 10.1111/clr.13455

ORIGINAL RESEARCH

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH WILEY

Biofilm formation on dental implants with different surface micro-topography: An in vitro study

Patricia Bermejo¹  | María Carmen Sánchez^{1,2} | Arancha Llama-Palacios^{1,2}  |
Elena Figueroa²  | David Herrera²  | Mariano Sanz Alonso² 

¹Laboratory of Oral Microbiology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain

²ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, University Complutense, Madrid, Spain

Correspondence

Elena Figueroa, ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, Department of Dental Clinical Specialties, Faculty of Dentistry, University Complutense, Plaza Ramón y Cajal s/n – Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.
Email: elfigueroa@ucm.es

Abstract

Objectives: To compare biofilm formation on whole dental titanium implants with different surface micro-topography.

Methods: A multispecies in vitro biofilm model consisting of initial (*Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii*), early (*Veillonella parvula*), secondary (*Fusobacterium nucleatum*) and late colonizers (*Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) was grown for 96 hr on sterile titanium dental implants with either minimal (S_a : 0.5–1.0 mm) or moderate-roughness titanium surfaces (S_a : 1.1–2.0 mm). The resulting biofilms were studied with Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and Scanning Electron Microscope. Concentrations (colony-forming units per mL [CFU/mL]) of each bacterium were measured by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and compared by Student *t* tests.

Results: A biofilm, located mainly at the peak and lateral areas of the implant threads, was observed on both implant surfaces, with a greater biomass and a greater live/dead ratio in moderate- compared to minimal-roughness surface implants. Statistically significant higher values of total bacteria (mean difference = 2.61×10^7 CFU/mL; 95% confidence interval – CI [1.91×10^6 ; 5.02×10^7]; $p = 0.036$), *F. nucleatum* (mean difference = 4.43×10^6 CFU/mL; 95% CI [1.06×10^6 ; 7.80×10^6]; $p = 0.013$) and *A. actinomycetemcomitans* (mean difference = 2.55×10^7 CFU/mL; 95% CI [1.07×10^7 ; 4.04×10^7]; $p = 0.002$), were found in the moderate- compared to minimal-roughness surface dental implants.

Conclusions: Implants with moderate-roughness surfaces accumulated more bacterial biomass and significant higher number of pathogenic bacteria (*F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans*), when compared to implants with minimal-roughness surfaces, within a similar biofilm structure.

KEYWORDS

biofilms, dental implants, microscopy, Real-Time Polymerase Chain Reaction, titanium

1 | INTRODUCTION

Implant-supported prosthesis has demonstrated a high predictability in the long-term rehabilitation of both function and aesthetics of partially and fully edentulous patients (Berglundh, Persson, & Klinge, 2002; Quirynen, De Soete, & van Steenberghe, 2002). This high predictability is partially due to the establishment of a direct contact between the implant titanium surface and the functional bone (osseointegration) (Cordeiro & Barao, 2017; Long & Rack, 1998; Quirynen et al., 2015). With the aim of improving the dynamics of osseointegration, different modifications in the implant surface micro-topography increased its predictability and reduced the time to achieve implant stability and clinical success (Albrektsson & Wennerberg, 2004; Gutwein & Webster, 2004; Meirelles, Arvidsson, Albrektsson, & Wennerberg, 2007; Schwartz-Filho et al., 2012; Wennerberg et al., 2011). These modifications have involved modifications in the physico-chemical characteristics of the surface, mainly its roughness, surface free energy and wettability, demonstrating improved osteoblast activity, synthesis of extracellular matrix and bone mineralization (Albrektsson & Wennerberg, 2004; Ferreira Ribeiro et al., 2016; Gutwein & Webster, 2004; Meirelles et al., 2007; Schwartz-Filho et al., 2012; Wennerberg et al., 2011). These results have resulted in that 95% of the surfaces in currently commercialized implant systems are composed of titanium or titanium alloys with a moderately rough micro surface topography (Rasperini, Maglione, Cocconcelli, & Simion, 1998; Teughels, Van Assche, Sliepen, & Quirynen, 2006; Wu-Yuan, Eganhouse, Keller, & Walters, 1995).

When inserted in the bone, dental implants should have all their rough surface covered by bone, and hence not exposed to the soft tissue attachment or oral environment. It is, however, not infrequent that due to crestal bone remodelling during postoperative healing or a supracrestal positioning of part of the implant neck, the most coronal portion of the implant surface might not be covered with bone and, in case of an inefficient soft tissue seal, become exposed to the contaminated oral environment. In these circumstances, it has been hypothesized that surfaces with increased roughness may promote bacterial adhesion or increased difficulty in their control by oral hygiene practices, thus leading to a chronic inflammatory response in the peri-implant tissues, with the risk of development of peri-implant diseases (Al-Ahmad et al., 2013; Burgers et al., 2010; Rasperini et al., 1998; Schmidlin et al., 2013; Teughels et al., 2006; Wu-Yuan et al., 1995; Zitzmann & Berglundh, 2008).

Different *in vivo* (Al-Ahmad et al., 2016, 2013; de Melo, do Nascimento, Souza, & de Albuquerque, 2017; Ferreira Ribeiro et al., 2016; Groessner-Schreiber, Hannig, Duck, Griepentrog, & Wenderoth, 2004; John, Becker, & Schwarz, 2015, 2017; Xing, Lyngstadaas, Ellingsen, Taxt-Lamolle, & Haugen, 2015; Zaugg et al., 2017) and *in vitro* (Badihi Hauslich, Sela, Steinberg, Rosen, & Kohavi, 2013; Di Giulio et al., 2016; Drake, Paul, & Keller, 1999; Montelongo-Jauregui, Srinivasan, Ramasubramanian, & Lopez-Ribot, 2018; Pita et al., 2015; Sanchez et al., 2014a; Schmidlin et al., 2013; Violant, Galofre, Nart, & Teles, 2014) investigations have studied the impact of implant surface characteristics on biofilm formation,

demonstrating that the physico-chemical characteristics of the surface, mainly its roughness, significantly affected early bacterial colonization, biofilm formation and maturation (Burgers et al., 2010; Teughels et al., 2006). However, most of these studies have not used dental implants, but rather specimens, such as discs or slabs made of the implant surfaces, but without taking into account the implant macroscopic and topographic characteristics, such as the threads and the inter-thread concavities. In fact, a recent publication from our research group (Bermejo et al., 2019) has demonstrated different patterns of bacterial colonization and biofilm deposition depending on the topographic area in dental implants.

It is, therefore, the aim of this *in vitro* investigation to assess the biofilm formation on dental titanium implants with different surface micro-topography (minimal-roughness titanium surfaces [S_a : 0.5–1.0 mm] versus moderate-roughness titanium surfaces [S_a : 1.1–2.0 mm]) (Albrektsson & Wennerberg, 2004), using a previously validated multispecies *in vitro* biofilm model.

2 | MATERIAL AND METHODS

CRIS guidelines (Checklist for reporting *in vitro* studies) have been followed, although specific checklist these guidelines have not yet been published.

2.1 | Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains of *Streptococcus oralis* CECT 907T, *Veillonella parvula* NCTC 11810, *Actinomyces naeslundii* ATCC 19039, *Fusobacterium nucleatum* DMSZ 20482, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSMZ 8324 and *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 were grown on blood agar plates (Blood Agar Oxoid No 2; Oxoid), supplemented with 5% (v/v) sterile horse blood (Oxoid), 5.0 mg/L hemin (Sigma) and 1.0 mg/L menadione (Merck) under anaerobic conditions (10% H_2 , 10% CO_2 , and balance N_2) at 37°C for 24–72 hr.

2.2 | Dental implants

Sterile units of whole titanium dental implants with different surface micro-topography were used. As minimal-roughness surface implants, 3i Full Certain® implants of 10 mm in length and 3.25/3.4 mm in diameter were used (Implant Innovations, Inc.). These implants have a patented acid-etched surface (Osseotite®) with a surface roughness of $S_{a_{25}}$ 0.5–1 (Zimmer Biomet, St. Warsaw, IN, USA). 3i Full OSSEOTITE® Certain® implants presented a thread pitch of 0.6 mm, a threaded length of 8.5 mm and a diameter that varies between 3.3–3.4 in the threaded body and 2.6 mm in the tip (Zimmer Biomet). As moderate-roughness surface implants, Nobel Biocare Brånemark System® Mk III Groovy RP of 10 mm in length and 3.75 mm in diameter were used (Nobel Biocare AB). These implants have a patented surface (TiUnit®) consisting of a moderately rough coating of highly crystalline titanium oxide enriched with phosphorus ($S_{a_{25}}$ 1–2 μ ; Nobel Biocare, Göteborg, Sweden). Nobel Biocare Brånemark

System® Mk III Groovy RP implants presented a thread pitch of 1.2 mm and a thread spacing of 0.6 mm (double-lead thread). The length of the threaded area was 8.9 mm and the diameter varies between 3.1 and 3.7 mm in threaded body and reaches 2.9 mm in the tip (Nobel Biocare).

Both employed presented a cylindrical body shape with a flat apex and a grooved apical zone.

2.3 | Biofilm development

The biofilms were grown on the whole implant surface using the protocol previously reported by our research group (Bermejo et al., 2019). In brief, the obtained pure cultures of each bacterium were grown anaerobically in a brain-heart infusion (BHI) modified medium, a protein-rich medium containing BHI (Becton, Dickinson and Company) supplemented with 2.5 g/L mucin (Oxoid), 1.0 g/L yeast extract (Oxoid), 0.1 g/L cysteine (Sigma), 2.0 g/L sodium bicarbonate (Merck), 5.0 mg/L hemin (Sigma), 1.0 mg/L menadione (Merck) and 0.25% (v/v) glutamic acid (Sigma), during 24–48 hr. After 24 hr, each bacterial culture was assessed with spectrophotometry to collect the inoculum at mid-exponential phase, creating then a mix of bacteria containing 10^3 colony-forming units per ml (CFU/ml) of *S. oralis*, 10^5 CFU/ml of *A. naeslundii* and *V. parvula*, and 10^6 CFU/ml of *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. The sterile implants were placed in wells of a 24-well tissue culture plate (Greiner Bio-one), and each implant was then inoculated with 1.5 ml of the bacterial mix suspension. Culture plates were then incubated at 37°C in anaerobic conditions (10% H₂, 10% CO₂, and balance N₂) for 96 hr. As control, plates without implants, containing the culture medium in order to assess for possible contamination, were used.

2.4 | Morphological analysis of the biofilms by Scanning Electron Microscopy (SEM)

After an incubation time of 96 hr in contact with bacteria, and before the SEM analysis, implants were sequentially rinsed three times with 2 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) (immersion time per rinse, 10 s) to remove non-adherent bacteria. The implants were then fixed in a solution of 4% paraformaldehyde (Panreac Quimica) and 2.5% glutaraldehyde (Panreac Quimica) for 4 hr, at 4°C, and washed in PBS and in sterile water (immersion time per washed 10 min). The specimens were then dehydrated through a series of graded ethanol solutions (30%, 50%, 70%, 80%, 90% and 100%; immersion time per series 10 min). After that, implants were critically point-dried, sputter-coated with gold and analysed by an electron microscope JSM 6400 (JSM 6400; JEOL), with a back-scattered electron detector and an image resolution of 25 kV. At least three implants of each group of surface roughness were analysed. This microscopic analysis was carried out at the ICTS National Center of Electronic Microscopy (International Excellence Campus of Moncloa, University Complutense, Madrid, Spain).

2.5 | Biofilm biomass and biofilm vitality by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

An Olympus® FV1200 confocal microscope (Olympus Iberia) was used to evaluate the morphology of fully hydrated biofilms. Prior to the evaluation by microscopy, three samples of each group of surface roughness under study were incubated during 96 hr in the presence of the bacterial strains. The resulting biofilm contaminated implants were then sequentially rinsed three times with 2 ml of sterile PBS (immersion time per rinse, 10 s) to remove non-adherent bacteria. These specimens were then stained with LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit solution (Molecular Probes B. V.) at room temperature. The 1:1 fluorochrome ratio with a staining time of 9 ± 1 min was used to obtain the optimum fluorescence signal at the corresponding wavelengths (SYTO9®, 515–530 nm; Propidium Iode, >600 nm). The CLSM software was set to take a z-series of scans (xyz) of 1.16 µm thickness (12 bits, 1,024 × 1,024 pixel). Image stacks were analysed with the Imaris 7.7.0® software (Bitplane). Three separate and representative surface areas of each implant topography were selected for the analysis: (a) the implant thread; (b) the area between the threads; and (c) the implant thread peak. Analyses were carried out at the National Centre for Cytometry and Fluorescence Microscopy (International Excellence Campus of Moncloa, University Complutense, Madrid, Spain).

Image analysis and live/dead cell ratio (i.e., the area occupied by alive cells divided by the area occupied by dead cells) were performed with Fiji software (ImageJ Version 2.0.0-rc-65/1.52b, Open-source image processing software). COMSTAT (available as free downloadable software at www.comstat.dk) was used to calculate the biomass in micrometer³/micrometer² (µm³/µm²) of images obtained by CLSM of different surface roughness.

2.6 | Quantitative evaluation of bacteria by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Before DNA isolation, biofilm contaminated implants were rinsed in 2 ml of sterile PBS and dislodged by vortex at room temperature, during 2 min in 1 ml of sterile PBS. DNA was then extracted using a commercial kit (MoYsisComplete5; Molzym GmbH & CoKG) following manufacturer's instructions. The hydrolysis probes 5' nuclease assay PCR method was used for detecting and quantifying bacterial DNA. Primers and probes were provided by Life Technologies Invitrogen, Applied Biosystems and Roche (Roche Diagnostic GmbH) and were targeted against 16S rRNA gene (Sanchez et al., 2014a). The qPCR amplification was performed in a total reaction mixture volume of 10 µl. The reaction mixtures were contained in 5 µl of 2× master mixture (LC 480 Probes Master; Roche). Optimal concentrations of primers and probes within 2 µl of DNA were 900, 900 and 300 nM for *S. oralis*; 300, 300 and 300 nM for *A. naeslundii*; 750, 750 and 400 nM for *V. parvula*; 300, 300 and 200 nM for *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 and 300 nM, for *P. gingivalis* and 600, 600 and 300 nM for *F. nucleatum*. The negative control was 2 µl of sterile water [non-template control (NTC)] (Water PCR grade, Roche).

The samples were subjected to an initial amplification cycle of 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Analyses were performed with a LightCycler® 480 II thermocycler (Roche). The plates used in the study were FramStar 480 of natural frame and white wells (4titude; The North Barn; Damphurst Lane, UK), sealed by QPCR Adhesive Clear Seals (4titude).

Each DNA sample was analysed in duplicate. Quantification cycle (C_q) values were determined using the provided software package (LC 480 Software 1.5; Roche). Quantification of viable cells by qPCR was based on standard curves. The correlation between C_q values and CFU/ml will be automatically generated through the software (LC 480 Software 1.5; Roche).

This protocol was repeated in three independent experiments, each with three replicas of each surface topography ($n = 9$ in each group).

2.7 | Statistical analysis

Live/dead ratios, biomass ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) and concentrations (CFU/ml) for each bacterium were considered as outcome variables.

Data distribution on the concentration of each bacterium was tested out through box-plot and Shapiro-Wilk goodness-of-fit test. Descriptive statistics by means and standard deviations (SD) were calculated. Comparisons between groups were performed by Student *t* test. $p < 0.05$ value is considered statistically significant.

A software package (IBM SPSS Statistics 24.0; IBM Corporation) was used.

Live/dead ratios and biomass were compared through the use of COMSTAT software.

3 | RESULTS

3.1 | CLSM analysis of biofilm biomass and biofilm vitality

Figure 1 depicts the presence of 96 hr-biofilms on both tested surfaces, with a variable distribution of the colonies along the implant surface.

In minimal-roughness surface implants, CLSM images depicted microcolonies of bacteria, with a high predominance of live versus dead bacteria [mean live/dead cell ratio of 5.41 [standard deviation (SD) = 2.95] (Figure 1a,b, with live bacteria in green and dead in red colour). Although bacteria colonized, in general, the whole surface of the implant, microcolonies were mostly deposited in the peaks and lateral surfaces of the threads, while the area between threads was predominantly devoid of bacteria (Figure 1a,b; in blue, the implant surface).

In moderate-roughness surface implants, biofilms also showed a predominance of live versus dead bacteria [mean live/dead cell

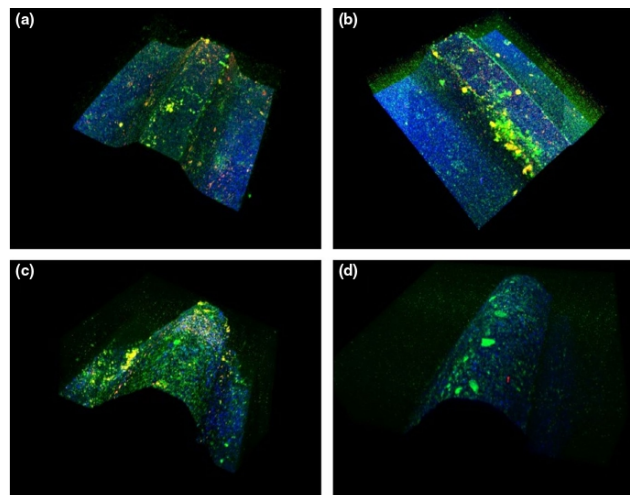


FIGURE 1 Images obtained by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM, 20×) at 96 hr of incubation of biofilm over whole dental implants with minimal-roughness (a, b) and moderate-roughness surfaces (c, d), using LIVE/DEAD® BacLight Kit. It is possible to differentiate live bacteria (in green), dead bacteria (in red) and implant surface (in blue, by their own fluorescence). Images a and b showed bacterial cells grouped in microcolonies and a predominance of live bacteria against dead. Microcolonies are mostly concentrated and covering completely the lateral surfaces and the peak of the threads, while the area between threads depicts mostly implant material. Images c and d also showed a predominance of live bacteria over dead. Similar bacterial disposition and distribution to those found in minimal-roughness surfaces was observed, with bacteria grouped in colonies showing preference for the lateral surfaces and the peak of the implant threads, being less appreciable in the area between threads

ratio of 7.44 ($SD = 2.97$)] with a similar distribution of bacterial microcolonies, with bacteria spread over the whole surface of the implant, mainly at the peak and lateral surfaces of the implant threads, while a lesser accumulation was evident in the area between threads (Figure 1c,d).

The quantitative evaluation of the CLSM images showed a greater biomass in moderate-roughness surface implants ($0.028 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ [$SD = 0.002 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$]) when compared to minimal-roughness surface implants ($0.015 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ [$SD = 0.022 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$]).

3.2 | Morphological analysis of the biofilms by SEM

After biofilm development (96 hr of incubation), a mature biofilm could be recognised in both surfaces (Figure 2). In minimal-roughness surface implants, bacteria were identified in large stacks with presence of broad channels between these stacks (Figure 3b, white arrows). Spindle-shaped rods (suggestive of *F. nucleatum*) were identified forming three-dimensional structures with adhered short streptococcal chains (*S. oralis*) (Figure 3a,b, blue arrows). The whole surface of the implant was covered by a thick extracellular matrix (Figure 3b, green arrow).

Moderate-roughness surface implants showed biofilms with similar structural characteristics (Figure 3c,d). A dense extracellular matrix covering the complete surface was observed, with bacteria organized in stacks among broad channels (Figure 3d, green and white arrows). Spindle-shaped rods and adhered short streptococcal chains grouped in colonies forming complex networks could be observed (Figure 3c, blue arrow).

Scanning Electron Microscopy images highlighted that moderate-roughness surfaces harboured bacterial cells inside their characteristic pores. However, this did not happen on minimal-roughness surfaces, where the diameter of the pores did not allow growth of the bacteria within them (Figure 3c, white arrow).

3.3 | Quantitative evaluation of bacteria by Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Table 1 shows the numbers of each bacterial species in both implant groups and Figure 4 depicts the relative distribution of the different bacterial species in each type of implant.

Biofilms formed on moderate and minimal-roughness topography did not show significant differences in the numbers (CFU/ml) of initial and early colonizers (*S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*) ($p > 0.05$).

Fusobacterium nucleatum was detected in biofilms on both implant surfaces, but significantly lower concentrations were shown in minimal-roughness surface implants when compared with moderate-roughness surface implants (mean difference = 4.43×10^6 CFU/ml; 95% CI [1.06×10^6 ; 7.80×10^6]; $p = 0.013$).

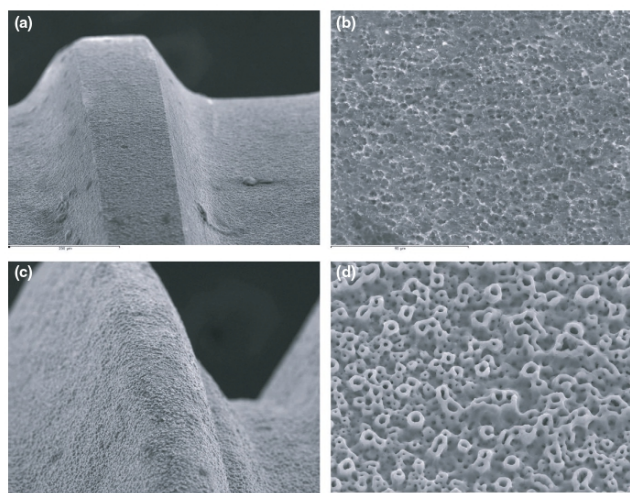
While the late colonizer, *P. gingivalis*, was detected in biofilms of both implant surfaces with similar concentrations ($p = 0.564$), *A. Actinomycetemcomitans* showed significantly higher concentrations in moderate-roughness surface implants when compared with minimal-roughness surface implants (mean difference = 2.55×10^7 CFU/ml; 95% CI [1.07×10^7 ; 4.04×10^7]; $p = 0.002$).

When the total quantity of bacteria on the whole implant surfaces was calculated, moderate-roughness surface implants accumulated significantly higher numbers than minimal-roughness surface (mean difference = 2.61×10^7 CFU/ml; 95% CI [1.91×10^6 ; 5.02×10^7]; $p = 0.036$).

4 | DISCUSSION

The results from this in vitro investigation, aimed to analyse the qualitative and quantitative differences in biofilm formation on implants

FIGURE 2 Images obtained by Scanning Electron Microscope (SEM) of whole dental implant surfaces. Images a (200 \times ; scale bar 200 μm) and c (200 \times ; scale bar 200 μm) showed the differences between the macro-topography of (a) the minimal-roughness whole dental implant and (c) moderate-roughness whole dental implant. Images b (1,000 \times ; scale bar 50 μm) and d (1,000 \times ; scale bar 50 μm) showed the differences in micro-topography and diameter of the surface pores of (b) minimal-roughness implants and (d) moderate-roughness implants



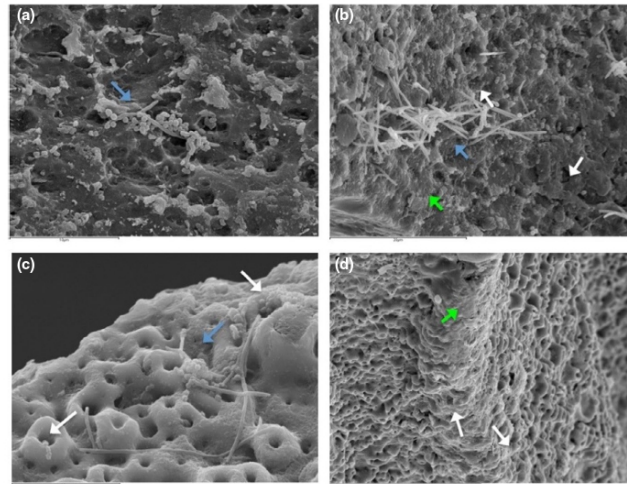


FIGURE 3 Images obtained by Scanning Electron Microscope (SEM) of biofilms developed for 96 hr over whole dental implants. Images a (4,000 \times ; scale bar 10 μ m) and b (2,500 \times ; scale bar 20 μ m) showed consolidated biofilms in minimal-roughness surface. It stands out spindle-shaped rods forming three-dimensional structures and short streptococcal chains adhered, recognized as *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus oralis*, respectively (a-b, blue arrows) surrounded by a thick extracellular matrix covering the entire surface (b, green arrow). Bacteria were observed in larger stacks (growing masses of bacterial cells) with broad channels among the stacks (b, white arrows). Images c (1,800 \times ; scale bar 10 μ m) and d (800 \times ; scale bar 70 μ m) showed biofilms in moderate-roughness surface implants with similar structural characteristics to those found in minimal-roughness surfaces. Spindle-shaped rods structures and short streptococcal chains adhered forming complex networks grouped in colonies (c, blue arrow), surrounded by a dense extracellular matrix covering the surface (d, green arrow). Bacteria are also disposed in larger stacks with broad channels among the stacks (d, white arrows). Bacteria introduced inside the bigger pores are highlighted (c, white arrows)

with two distinct microsurface topographies, have demonstrated that 96 hr multispecies biofilms formed on both implant surfaces, showed no significant qualitative differences, when evaluated with CLSM and SEM, although with CLSM, a significantly greater biomass was measured in moderate-roughness surface implants when compared to minimal-roughness surface implants (0.015 vs. 0.028 μ m³/ μ m², respectively). Similarly, with SEM, a higher number of bacteria were identified within their characteristic surface micropores in the moderate-roughness surface implants. Using quantitative qPCR, a significantly higher number of total bacteria and concentrations of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* were measured on moderate-roughness when compared with minimal-roughness surfaces.

The evaluation with CLSM demonstrated biofilms consisting on live microcolonies deposited mainly on the lateral surfaces and the peaks of the implant threads, with minimal bacterial deposits in the area between threads. In contrast with these results, Matos et al. (Matos et al., 2017), also using CLSM analysis on an in vitro three-species biofilm model on commercially pure titanium surfaces, did not report any impact of the different surfaces on the bacterial organization and distribution of the microcolonies within the biofilms. Similarly, the CLSMs patterns described by Sanchez et al. (2014a) on titanium discs, described bacterial microcolonies spread over the whole surface of the disc, with minimal differences

on the bacterial deposition and distribution when different surfaces were compared. In contrast, a recent report from our research group, using a similar methodology (Bermejo et al., 2019) but on whole dental implants, instead of discs, demonstrated clear differences between the microcolonies deposited at the peaks of the threads from those at the valleys between the threads. It is likely that the differences in the biofilms identified in this investigation, when comparing different microsurface topographies on whole implants, represent a model closer to the clinical reality than when using discs.

The use of SEM demonstrated mature biofilms in both minimal- and moderate-roughness surfaces, with bacterial communities forming large stacks in between broad channels, all surrounded with a thick extracellular matrix covering the whole implant surface. A similar morphological structure has been shown in previous studies evaluating biofilm formation on titanium discs (Bermejo et al., 2019; Cavalcanti et al., 2016; Sanchez et al., 2014a). Similar to our results, no structural differences in the biofilm were identified when comparing discs with different titanium surfaces (Di Giulio et al., 2016; Ferreira Ribeiro et al., 2016; Pita et al., 2015; Scarano, Piattelli, Caputi, Favero, & Piattelli, 2004; Schmidlin et al., 2013). However, this investigation demonstrated that moderate-roughness surfaces showed a higher number of bacteria within their characteristic

TABLE 1 Comparison of the effect of the roughness surface (moderate-roughness and minimal-roughness) of dental implants on number of the six bacterial species and total bacteria expressed in colony-forming unit/ml (CFU/ml)

Bacteria	Surface	Mean	SD	Mean differences	95% Confidence Interval for Mean differences		p-value
					Lower Bound	Upper Bound	
Total bacteria	Moderate	1.26×10^8	2.38×10^7	2.61×10^7	1.91×10^6	5.02×10^7	0.036
	Minimal	1.00×10^8	2.45×10^7				
<i>Streptococcus oralis</i>	Moderate	2.66×10^7	1.18×10^7	-1.77×10^6	-1.46×10^7	1.11×10^7	0.775
	Minimal	2.84×10^7	1.39×10^7				
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Moderate	3.13×10^5	1.04×10^5	4.86×10^4	-9.87×10^4	1.96×10^5	0.495
	Minimal	2.65×10^5	1.81×10^5				
<i>Veillonella parvula</i>	Moderate	1.99×10^7	7.51×10^6	-4.16×10^6	-2.08×10^7	1.25×10^7	0.586
	Minimal	2.40×10^7	2.12×10^7				
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Moderate	9.31×10^6	3.08×10^6	4.43×10^6	1.06×10^6	7.80×10^6	0.013
	Minimal	4.88×10^6	3.64×10^6				
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Moderate	1.43×10^7	3.70×10^6	1.99×10^6	-5.19×10^6	9.18×10^6	0.564
	Minimal	1.23×10^7	9.47×10^6				
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Moderate	5.57×10^7	1.59×10^7	2.55×10^7	1.07×10^7	4.04×10^7	0.002
	Minimal	3.02×10^7	1.37×10^7				

Abbreviation: SD, standard deviation.

pores. Similar morphological differences were also reported using SEM by Ferreira Ribeiro et al. (2016) in an in vivo investigation assessing the initial bacterial adhesion on titanium discs with different surface micro-topography (Ferreira Ribeiro et al., 2016). Presence of

bacteria within the pores in moderate-roughness surfaces were also noted, what may have implications, not only with the accumulation of larger numbers of bacteria, but with likely more difficulty for their removal.

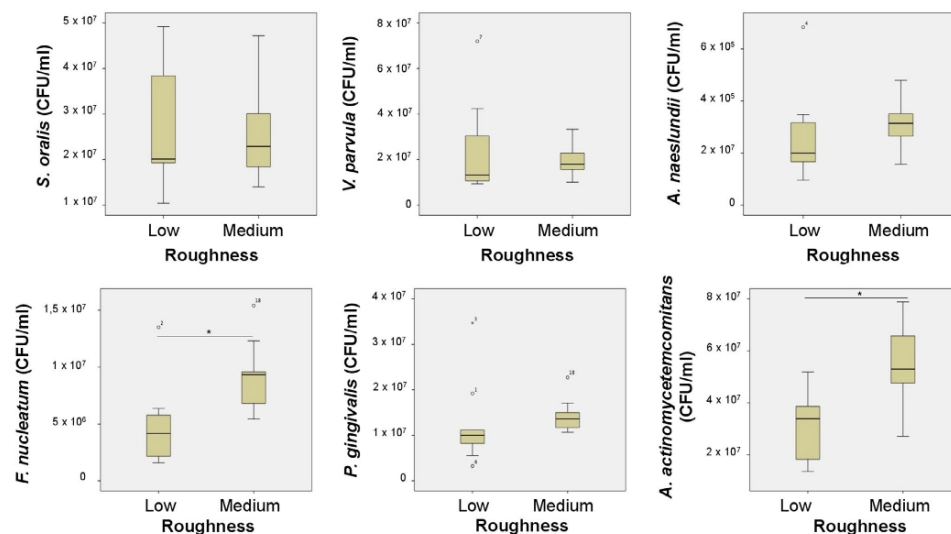


FIGURE 4 Data distribution after statistical analysis of the numbers of bacteria expressed as colony-forming unit/ml (CFU/ml) on whole dental implants with different roughness surfaces, minimal-roughness surface (N = 9) and moderate-roughness surface (N = 9), obtained by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) from biofilms of 96 hr of incubation, using specific primers and probes directed to the 16S rRNA gene. Statistically significant differences between both surfaces were found for bacteria *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*p < 0.05)

The quantitative results assessed by both CLSM and qPCR resulted in a higher biomass volume and higher numbers of total bacteria on moderate-roughness surface implants. These results are in agreement with those reported by Bevilacqua, Milan, Del Lupo, Maglione and Dolzani (2018) or Drago et al. (2016), in terms of biomass, and by Burgers et al. (2010), in terms of qPCR, thus supporting the hypothesis that moderate-roughness surfaces accumulate more bacteria and larger biofilms. Furthermore, these investigations demonstrated significantly higher concentrations of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in moderate-roughness surfaces when compared to minimal-roughness surface implants. Similar results have also been reported by other authors, stating that rougher surfaces accumulated more bacteria and were more pathogenic (Subramani, Jung, Molenberg, & Hammerle, 2009). In fact, de Melo et al. (2017), in an in vivo study on bacterial colonization of titanium implant surfaces, did not report quantitative differences in the number of bacteria, but found higher counts of pathogenic bacteria in rougher surfaces. There is controversy on when is the critical point in biofilm development in which surface roughness could have a bigger impact (adhesion, growth or maturation). Some studies have reported a greater influence at early stages (Al-Ahmad et al., 2010; Dal Agnol et al., 2015; Frojd et al., 2011; Lin, Liu, Wismeijer, Crielaard, & Deng, 2013), while others have shown a higher impact of rougher surfaces with increasing amounts of bacteria, as biofilms become mature (Al-Ahmad et al., 2016; John, Becker, & Schwarz, 2015). Further studies are needed to identify the critical point in biofilm development for surface topography to have a bigger impact.

The employed implants (3i Full OSSEOTITE® Certain® implants and Nobel Biocare Brånemark System® Mk III Groovy RP) in spite of sharing a similar macro-structural design (threaded cylindrical body with a flat apex and a grooved apical area), they have distinct differences in their thread pitch [0.6 vs. 1.2 mm], threaded area length [8.5 vs. 8.9 mm], major and minor diameter in threaded body [3.25–3.4 to 3.1–3.7 mm] and tip diameter [2.6 vs. 2.9 mm]). Since it is impossible to compare two commercially available implants with identical structural characteristics, the possible influence of these differences in the biofilm formation and number and quality of the bacterial accumulation should not be overlooked, mainly when comparing an implant with a moderate-roughness surface (Nobel Biocare Brånemark System® Mk III Groovy RP) and a slightly greater surface area versus another implant with a minimal-roughness surface (3i Full OSSEOTITE® Certain®).

Due to its in vitro nature, this investigation presents clear limitations and its translation to the clinical reality should be interpreted with caution. However, the in vitro biofilm model used in this investigation, combining a multispecies biofilm grown on whole implant surfaces, may have clear advantages over the use of mono-species biofilms and their growth on flat surfaces, such as discs, which are very distant from the clinical reality.

Despite these limitations and the observational nature of this investigation, this in vitro study has shown that (a) multispecies biofilms grew in both implant surfaces, without significant structural

or qualitative differences, but with a significantly greater biomass measured in moderate-roughness surface implants when compared to minimal-roughness surface implants, and (b) moderate-roughness surfaces accumulated more bacteria and these bacteria were more pathogenic.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was self-funded by the ETEP Research Group within the activities of the *Cátedra Extraordinaria Dentaid en Investigación Periodontal* (University Complutense, Madrid). Authors would like to thank the technical support of Dr. A.M. Vicente, at the ICTS National Centre of Electron Microscopy (University Complutense, Madrid, Spain), and A. Cortés and Dr. C. Pérez, at the Center of Microscopy and Cytometry (University Complutense, Madrid, Spain).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests with this research; however, all potential conflict of interests have been listed here. Dr. Sanz Alonso reports Personal fees from Colgate, Procter & Gamble, Straumann, Denstply, GSK, Geistlich, Dentium, Nobelbiocare, Camlog, grants through the university with Nobelbiocare, Straumann, Geislich, Dentaid, Mozo-Grau, Camlog, Sweden & Martina, Dentium, Colgate, Procter & Gamble, Sunstar outside the submitted work. Dr. Herrera reports Personal fees from Colgate, Kulzer, Dexcel, Klockner, Denstply, Johnson & Johnson, grants from Kulzer, Affinity PetCare, Dentaid, outside the submitted work. Dr. Figuero reports Personal fees from Oral-B, Straumann, Dentaid and Colgate, grants from Dentaid, outside the submitted work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.S.A., D.H. and M.C.S. conceived the idea; P.B., M.C.S. & A.L.P. collected the data; E.F. and P.B. analysed the data; and P.B., M.S.A., D.H. & E.F. led the writing.

ORCID

Patricia Bermejo  <https://orcid.org/0000-0003-4122-4273>

Arancha Llama-Palacios  <https://orcid.org/0000-0001-6486-0120>

Elena Figuero  <https://orcid.org/0000-0002-3129-1416>

David Herrera  <https://orcid.org/0000-0002-5554-2777>

Mariano Sanz Alonso  <https://orcid.org/0000-0002-6293-5755>

REFERENCES

- Al-Ahmad, A., Karygianni, L., Schulze Wartenhorst, M., Bächle, M., Hellwig, E., Follo, M., ... Han, J.-S. (2016). Bacterial adhesion and biofilm formation on yttria-stabilized, tetragonal zirconia and titanium oral implant materials with low surface roughness - an in situ study. *Journal of Medical Microbiology*, 65(7), 596–604. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000267>

- Al-Ahmad, A., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Fackler, A., Follo, M., Hellwig, E., Bächle, M., ... Kohal, R. (2013). In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Archives of Oral Biology*, 58(9), 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.04.011>
- Al-Ahmad, A., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Faust, J., Bächle, M., Follo, M., Wolkewitz, M., ... Kohal, R. (2010). Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 95(1), 101–109. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31688>
- Albrektsson, T., & Wennerberg, A. (2004). Oral implant surfaces: Part 1—review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *International Journal of Prosthodontics*, 17(5), 536–543.
- Badihi Hauslich, L., Sela, M. N., Steinberg, D., Rosen, G., & Kohavi, D. (2013). The adhesion of oral bacteria to modified titanium surfaces: Role of plasma proteins and electrostatic forces. *Clinical Oral Implants Research*, 24, 49–56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02364.x>
- Berglundh, T., Persson, L., & Klinge, B. (2002). A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 (s3), 197–212. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.29.s3.12.x>
- Bermejo, P., Sanchez, M. C., Llama-Palacios, A., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2019). Topographic characterization of multispecies biofilms growing on dental implant surfaces: An in vitro model. *Clinical Oral Implants Research*, 30, 229–241. <https://doi.org/10.1111/clr.13409>
- Bevilacqua, L., Milan, A., Del Lupo, V., Maglione, M., & Dolzani, L. (2018). Biofilms developed on dental implant titanium surfaces with different roughness: Comparison between in vitro and in vivo studies. *Current Microbiology*, 75(6), 766–772. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1446-8>
- Burgers, R., Gerlach, T., Hahnel, S., Schwarz, F., Handel, G., & Gosau, M. (2010). In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 21(2), 156–164. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01815.x>
- Cavalcanti, Y. W., Wilson, M., Lewis, M., Williams, D., Senna, P. M., Del-Bel-Cury, A. A., & da Silva, W. J. (2016). Salivary pellicles equalise surfaces' charges and modulate the virulence of *Candida albicans* biofilm. *Archives of Oral Biology*, 66, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.02.016>
- Cordeiro, J. M., & Barao, V. A. (2017). Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 71, 1201–1215. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.025>
- Dal Agnol, C. Z., Stefenon, L., van De Sande, F. H., Della Bona, Á., Cenci, M. S., Webber, B., ... dos Santos, L. R. (2015). Microcosm biofilm formation on titanium surfaces. *Materials Research*, 18, 677–682. <https://doi.org/10.1590/1516-1439.346814>
- de Melo, F., do Nascimento, C., Souza, D. O., & de Albuquerque, R. F. (2017). Identification of oral bacteria on titanium implant surfaces by 16S rDNA sequencing. *Clinical Oral Implants Research*, 28(6), 697–703. <https://doi.org/10.1111/clr.12865>
- Di Giulio, M., Traini, T., Sinjari, B., Nostro, A., Caputi, S., & Cellini, L. (2016). *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation in different titanium surfaces, an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research*, 27(7), 918–925. <https://doi.org/10.1111/clr.12659>
- Drago, L., Bortolin, M., De Vecchi, E., Agrappi, S., Weinstein, R. L., Mattina, R., & Francetti, L. (2016). Antibiofilm activity of sandblasted and laser-modified titanium against microorganisms isolated from peri-implantitis lesions. *Journal of Chemotherapy*, 28(5), 383–389. <https://doi.org/10.1080/1120009x.2016.1158489>
- Drake, D. R., Paul, J., & Keller, J. C. (1999). Primary bacterial colonization of implant surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 14(2), 226–232.
- Ferreira Ribeiro, C., Cogo-Muller, K., Franco, G. C., Silva-Concilio, L. R., Sampaio Campos, M., de Mello Rode, S., & Claro Neves, A. C. (2016). Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Archives of Oral Biology*, 69, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.05.006>
- Frojd, V., Chavez de Paz, L., Andersson, M., Wennerberg, A., Davies, J. R., & Svensater, G. (2011). In situ analysis of multispecies biofilm formation on customized titanium surfaces. *Molecular Oral Microbiology*, 26(4), 241–252. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2011.00610.x>
- Groessner-Schreiber, B., Hannig, M., Duck, A., Griepentrog, M., & Wenderoth, D. F. (2004). Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? *European Journal of Oral Sciences*, 112(6), 516–522. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00171.x>
- Gutwein, L. G., & Webster, T. J. (2004). Increased viable osteoblast density in the presence of nanophase compared to conventional alumina and titania particles. *Biomaterials*, 25(18), 4175–4183. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.090>
- John, G., Becker, J., & Schwarz, F. (2015). Modified implant surface with slower and less initial biofilm formation. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 17(3), 461–468. <https://doi.org/10.1111/cid.12140>
- John, G., Becker, J., & Schwarz, F. (2017). Effects of different titanium zirconium implant surfaces on initial supragingival plaque formation. *Clinical Oral Implants Research*, 28(7), e84–e90. <https://doi.org/10.1111/clr.12878>
- Lin, H. Y., Liu, Y., Wismeijer, D., Crielaard, W., & Deng, D. M. (2013). Effects of oral implant surface roughness on bacterial biofilm formation and treatment efficacy. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 28(5), 1226–1231. <https://doi.org/10.11607/jomi.3099>
- Long, M., & Rack, H. J. (1998). Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials*, 19(18), 1621–1639. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00146-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00146-4)
- Matos, A. O., Ricomini-Filho, A. P., Beline, T., Ogawa, E. S., Costa-Oliveira, B. E., de Almeida, A. B., ... Barão, V. A. R. (2017). Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 354–366. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.035>
- Meirelles, L., Arvidsson, A., Albrektsson, T., & Wennerberg, A. (2007). Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*, 18(3), 326–332. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01308.x>
- Montelongo-Jauregui, D., Srinivasan, A., Ramasubramanian, A. K., & Lopez-Ribot, J. L. (2018). An in vitro model for *Candida albicans* (*-*)*Streptococcus gordonii* biofilms on titanium surfaces. *Journal of Fungi (Basel)*, 4(2), 66. <https://doi.org/10.3390/jof4020066>
- Pita, P. P. C., Rodrigues, J. A., Ota-Tsuzuki, C., Miato, T. F., Zenobio, E. G., Giro, G., ... Shibli, J. A. (2015). Oral streptococci biofilm formation on different implant surface topographies. *BioMed Research International*, 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/159625>
- Quirynen, M., Al-Nawas, B., Meijer, H. J. A., Razavi, A., Reichert, T. E., Schimmel, M., ... Romeo, E. (2015). Small-diameter titanium Grade IV and titanium-zirconium implants in edentulous mandibles: Three-year results from a double-blind, randomized controlled trial. *Clinical Oral Implants Research*, 26(7), 831–840. <https://doi.org/10.1111/clr.12367>
- Quirynen, M., De Soete, M., & van Steenberghe, D. (2002). Infectious risks for oral implants: A review of the literature. *Clinical Oral Implants Research*, 13(1), 1–19. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130101.x>

- Rasperini, G., Maglione, M., Cocconcini, P., & Simion, M. (1998). In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: A comparative microbiological and SEM analysis. *Clinical Oral Implants Research*, 9(6), 357–364. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1996.090601.x>
- Sánchez, M. C., Llama-Palacios, A., Fernández, E., Figuero, E., Marín, M. J., León, R., ... Sanz, M. (2014a). An in vitro biofilm model associated to dental implants: Structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dental Materials*, 30(10), 1161–1171. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.07.008>
- Scarano, A., Piattelli, M., Caputi, S., Favero, G. A., & Piattelli, A. (2004). Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: An in vivo human study. *Journal of Periodontology*, 75(2), 292–296. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.2.292>
- Schmidlin, P. R., Muller, P., Attin, T., Wieland, M., Hofer, D., & Guggenheim, B. (2013). Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *Journal of Applied Oral Science*, 21(1), 48–55. <https://doi.org/10.1590/1678-7757201302312>
- Schwartz-Filho, H. O., Morandini, A. C. F., Ramos-Junior, E. S., Jimbo, R., Santos, C. F., Marcantonio, E., ... Marcantonio, R. A. C. (2012). Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(10), 2629–2636. <https://doi.org/10.1002/jbma.34200>
- Subramani, K., Jung, R. E., Molenberg, A., & Hammerle, C. H. (2009). Biofilm on dental implants: A review of the literature. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 24(4), 616–626.
- Teughels, W., Van Assche, N., Silepen, I., & Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17(Suppl 2), 68–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
- Violant, D., Galofre, M., Nart, J., & Teles, R. P. (2014). In vitro evaluation of multispecies oral biofilm on different implant surfaces. *Biomedical Materials*, 9(3), 035007. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/3/035007>
- Wennerberg, A., Fröjd, V., Olsson, M., Nannmark, U., Emanuelsson, L., Johansson, P., ... Thomsen, P. (2011). Nanoporous TiO₂ thin film on titanium oral implants for enhanced human soft tissue adhesion: A light and electron microscopy study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 13(3), 184–196. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2009.00207.x>
- Wu-Yuan, C. D., Eganhouse, K. J., Keller, J. C., & Walters, K. S. (1995). Oral bacterial attachment to titanium surfaces: A scanning electron microscopy study. *Journal of Oral Implantology*, 21(3), 207–213.
- Xing, R., Lyngstadaas, S. P., Ellingsen, J. E., Tøxt-Lamolle, S., & Haugen, H. J. (2015). The influence of surface nanoroughness, texture and chemistry of TiZr implant abutment on oral biofilm accumulation. *Clinical Oral Implants Research*, 26(6), 649–656. <https://doi.org/10.1111/clr.12354>
- Zaugg, L. K., Astasov-Frauenhoffer, M., Braissant, O., Hauser-Gerspach, I., Waltimo, T., & Zitzmann, N. U. (2017). Determinants of biofilm formation and cleanability of titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 28(4), 469–475. <https://doi.org/10.1111/clr.12821>
- Zitzmann, N. U., & Berglund, T. (2008). Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 286–291. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x>

How to cite this article: Bermejo P, Sánchez MC, Llama-Palacios A, Figuero E, Herrera D, Sanz Alonso M. Biofilm formation on dental implants with different surface microtopography: An in vitro study. *Clin Oral Impl Res*. 2019;00:1–10. <https://doi.org/10.1111/clr.13455>

*"Me pregunto si las estrellas se
iluminan con el fin de que algún día,
cada uno pueda encontrar la suya"*

*Antoine de Saint-Exupéry,
Le Petit Prince*

